



DIOGO MIGUEL  
ARAÚJO BATINA  
MAGALHÃES

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMA  
IMOBILIZADA PARA A PRODUÇÃO  
DE BIODIESEL**

Relatório de Dissertação do Mestrado em  
Engenharia Biológica e Química

**ORIENTADOR**

Professor Doutor Luís Fonseca

**COORIENTADORA**

Professora Doutora Fátima Serralha

Janeiro 2019

DIOGO MIGUEL  
ARAÚJO BATINA  
MAGALHÃES

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMA  
IMOBILIZADA PARA A PRODUÇÃO  
DE BIODIESEL**

**JÚRI**

*Presidente:* Professora Doutora Maria de Lurdes de  
Figueiredo Gameiro, ESTBarreiro/IPS

*Coorientadora:* Professora Doutora Maria de Fátima  
Nunes Serralha, ESTBarreiro/IPS

*Vogal:* Professor Doutor Pedro Carlos de Barros  
Fernandes, Universidade Lusófona de Humanidades  
e Tecnologias

Janeiro 2019





## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de dirigir os meus sinceros agradecimentos a todos os elementos do Instituto Superior Técnico que me acolheram durante o período de estágio e que a todos os níveis muitos ensinamentos me transmitiram.

Aos Professores Fátima Serralha e Luís Fonseca gostaria de agradecer o apoio, simpatia e estímulo que me prestaram, por toda a energia e motivação que me transmitiram, e também por me terem contagiado com a vossa boa disposição no trabalho. Do mesmo modo ainda gostava de agradecer a paciência, atenção e disponibilidade prestadas durante a realização do Estágio, especialmente durante a redação da tese.

Ao chefe do laboratório Filipe gostaria de agradecer toda a disponibilidade prestada durante a ausência dos meus orientadores e por todo o conhecimento transmitido.

Ao meu colega de laboratório João Prazeres gostaria de agradecer pelo apoio e companheirismo prestado.

Ao meu colega Petar Kekovic gostaria de agradecer pela assistência prestada na hora de correr as amostras no HPLC.

Aos meus colegas do IST, Josimar da Cruz, Pedro Rosado e Sofia Raposo gostaria de agradecer por todos os momentos de boa disposição partilhados durante as inúmeras alturas no decorrer deste estágio, que me permitiram descomprimir e ao mesmo tempo aproveitar devidamente o excelente ambiente que esta instituição disponibiliza.

À minha família do coração gostaria de agradecer toda a força de vontade que tiveram para me arrancar de casa nas minhas piores alturas e pela compreensão por não ter estado com eles todas as vezes que desejávamos.

Aos meus pais e avós gostaria de agradecer por todos os sacrifícios que realizaram para eu chegar onde me encontro, sem vocês não seria possível tamanha realização e pelo apoio incondicional sempre demonstrado em todos os momentos neste trabalho.

O meu muito obrigado a todos!



## Resumo

Procedeu-se à imobilização da cutinase recombinante de *Escherichia coli* (provenientes de diferentes lotes M3, J1 e J2) por adsorção em suportes hidrofóbicos (Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7, XAD-1180, Chauny XAD-16 e DIAION HP20), suportes inorgânicos (zeólitos NaA, NaX, CaA, NaY e alumina), suportes iônicos (Dowex 50W-X8, AG 50W-X8, AG 50W-X2, Amberlite IRC 50, IRA-400, IRA-458) e por ligação covalente (nos suportes comerciais metacrilato de epóxi butilo, metacrilato de epóxi e metacrilato de amina). O sobrenadante enzimático em contato com os suportes foi caracterizado a nível da atividade estereolítica (p-NPB) e proteína total (método de Bradford). Estudou-se a capacidade de esterificação da cutinase imobilizada nos diferentes suportes na síntese do laureato de propilo e do caproato de hexilo. Por último, foi estudada a reação de transesterificação para a produção do biodiesel utilizando suportes selecionados a partir dos estudos anteriores.

Os suportes hidrofóbicos (Amberlite XAD-7 e Amberlite XAD-1180), suporte inorgânico (alumina), suportes iônicos com ajuste de pH (Dowex 50W-X8, AG 50W-X8 e AG 50W-X2) e suportes por ligação covalente (metacrilato de epóxi butilo) apresentaram uma diminuição mais acentuada dos valores de atividade no sobrenadante e na proteína presente, o que representa maior quantidade de enzima imobilizada nos respectivos suportes. A cutinase (M3) imobilizada no suporte inorgânico alumina apresentou a melhor conversão (63%) na reação de síntese de caproato de hexil em comparação com os suportes hidrofóbicos e iônicos, mas menor do que Cal B (89%). Com os estudos da enzima imobilizada (M3 Concentrada) na alumina pré-equilibrada com a atividade de água a 0,97, pode-se concluir que sem a adição de água no início da reação de síntese do caproato de hexilo esta apresenta uma conversão de 83,3%. A cutinase (J2) imobilizada no suporte covalente metacrilato de epóxi butilo apresentou um grau de conversão (cerca de 90%) constante ao fim de 29 reutilizações. Na síntese do biodiesel, a partir da transesterificação do trioleína e metanol, a Cal B apresentou síntese de alguns ésteres e monoglicerídeos com a adição estereoquímica de metanol por 3 vezes ao longo do tempo da reação em relação à adição de metanol todo no início da reação. No entanto, a CAL B não realiza transesterificação com butanol e etanol adicionados no início da reação. Em oposição, a cutinase do lote J2 imobilizada por ligação covalente no suporte metacrilato de epóxi butilo mostra capacidade de síntese de alguns ésteres e monoglicerídeos quando a reação é feita com a adição de etanol no início da reação e sem adição de água no início da reação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cutinase, imobilização de enzimas, transesterificação, esterificação, biodiesel





## Abstract

Recombinant cutinase from *Escherichia coli* (from different batches M3, J1 and J2) was immobilized on hydrophobic supports (Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7, XAD-1180, Chauny XAD-16 and DIAION HP20), inorganic supports (zeolites NaA, CaA, NaY, NaX and alumina), ionic supports (Dowex 50W-X8, AG 50W-X8, AG 50W-X2, Amberlite IRC 50, IRA-400, IRA-458) and through covalent binding (on commercial supports epoxy/butyl methacrylate, epoxy methacrylate and amino methacrylate). The supernatant enzyme in contact with the supports was characterized by stereolytic activity (p-NPB) and total protein (Bradford method). The esterification ability of immobilized cutinase on the different supports in the synthesis of propyl laurate and hexyl caproate was studied. At last, the transesterification reaction for biodiesel production was studied using selected supports from previous studies.

The hydrophobic supports (Amberlite XAD-7 and Amberlite XAD-1180), inorganic support (alumina), ionic supports with pH adjustment (Dowex 50W-X8, AG 50W-X8 and AG 50W-X2) and covalent binding supports (epoxy/butyl methacrylate) showed a more visible decrease in activity and protein values, which represents a greater amount of enzyme immobilized in the respective supports. Immobilized cutinase (M3) on inorganic support alumina showed the best conversion (63%) of hexyl caproate in esterification reaction compared to hydrophobic and ionic supports, but less than Cal B (89%). With the studies of immobilized enzyme (M3 concentrated) in alumina pre equilibrated with water activity at 0.97, it can be concluded that without the addition of water at the beginning of the synthesis reaction of hexyl caproate has a conversion of 83.3%. The cutinase (J2) immobilized on the covalent epoxy/butyl methacrylate support presented a constant degree of conversion (around 90%) at the end of 29 reuses. In the synthesis of biodiesel from the transesterification of triolein and methanol, Cal B synthesized some esters and monoglycerides with the stereochemical addition of methanol 3 times during the reaction time in relation to the addition of all the methanol at the beginning of the reaction. However, Cal B does not transesterify with butanol and ethanol added at the start of the reaction. In contrast, cutinase from batch J2 immobilized by covalent binding on the epoxy/butyl methacrylate support shows the ability to synthesize some esters and monoglycerides when the reaction is carried out with the addition of ethanol at the beginning of the reaction and without the addition of water at the beginning of the reaction.

**KEYWORDS:** Cutinase, supports, enzyme immobilization, transesterification, esterification, biodiesel



## Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Índice Geral .....	vii
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas .....	xiii

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
----------------------------	----------

<b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
---------------------------------------	----------

<b>2.1. Biocatálise .....</b>	<b>3</b>
-------------------------------	----------

2.1.1. Catálise Enzimática .....	3
----------------------------------	---

2.1.2. Importância da água em catálise enzimática.....	3
--	---

2.1.3. Sistemas reacionais .....	4
----------------------------------	---

<b>2.2. Imobilização de enzimas em suportes sólidos.....</b>	<b>4</b>
--	----------

<b>2.3. Métodos de imobilização.....</b>	<b>5</b>
--	----------

2.3.1. Ligação iónica .....	5
-----------------------------	---

2.3.2. Ligação covalente .....	6
--------------------------------	---

2.3.3. Adsorção física .....	7
------------------------------	---

<b>Deposição .....</b>	<b>8</b>
------------------------	----------

<b>Precipitação .....</b>	<b>8</b>
---------------------------	----------

<b>Adsorção de forma restrita .....</b>	<b>8</b>
---	----------

2.3.3.3. Importância da água .....	9
------------------------------------	---

<b>2.4. Suportes.....</b>	<b>10</b>
---------------------------	-----------

2.4.1. Zeólitos .....	10
-----------------------	----

2.4.2. Suportes de resinas sintética .....	11
--	----

<b>2.5. Cutinase</b>	11
2.5.1. Origem	11
2.5.2. Clonagem e expressão da cutinase	12
2.5.3. Comportamento das esterases e lipases da cutinase	12
<b>2.6. Biodiesel</b>	13
2.6.1. Reações para produção do biodiesel	14
<b>Cracking térmico e/ou catalítico</b>	14
<b>Esterificação</b>	14
<b>Transesterificação</b>	14
2.6.2. Aplicações do biodiesel	16
<b>3. Materiais e Métodos</b>	17
<b>3.1. Materiais</b>	17
3.1.1. Suportes	17
3.1.2. Enzimas	19
3.1.3. Reagentes usados nos ensaios experimentais	19
<b>3.2. Equipamentos</b>	20
<b>3.3. Métodos</b>	21
3.3.1. Métodos de Imobilização	21
3.3.2. Preparações de suportes com enzima imobilizada com atividade da água ( $a_w$ ) constante	22
3.3.3. Determinação da proteína	22
Método Bradford	22
3.3.4. Determinação da atividade enzimática	23
Reação de hidrólise	23
Reação de síntese de laureato de propilo (PLU)	23
Reação de síntese do caproato de hexilo	24

3.3.5. Método titulométrico para a determinação da percentagem de conversão de ácido em éster .....	25
3.3.6. Síntese de Biodiesel .....	26
3.3.7. Estudos de reutilização dos suportes com enzima imobilizada na síntese dos ésteres.....	26
3.3.8. Leitura das amostras de biodiesel através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	26

## **4. Resultados e Discussão..... 27**

4.1. Teste e seleção de cutinase de diferentes estirpes de <i>E. coli</i> clonadas .....	27
4.2. Comparação das cutinases armazenadas com a produzida pela nova estirpe de cutinase.....	30
4.3. Adsorção da nova cutinase M3 em suportes hidrofóbicos .....	31
4.4. Adsorção da nova cutinase (M3) em suportes inorgânicos (zeólitos e alumina) .....	32
4.5. Adsorção da nova cutinase (M3) em suportes iônicos .....	33
4.6. Adsorção da nova cutinase (M3) em suportes covalentes .....	35
4.6.1. Aumento de escala .....	36
4.7. Caracterização da atividade da cutinase imobilizada na síntese do laureato de propilo .....	37
4.7.1. Efeito do teor de água na síntese do laureato de propilo da Cal B .....	40
4.8. Caracterização da atividade da cutinase imobilizada na síntese do caproato de hexilo .....	41
4.8.1. Efeito do teor em água inicial na síntese e da atividade da água na secagem da alumina.....	43
4.8.2. Efeito do teor de água no meio reacional na síntese do caproato de hexilo pela Cal B.....	45
4.9. Estudos de estabilidade (reutilizações) dos suportes com cutinase imobilizada .....	46
4.10. Síntese de Biodiesel .....	48
4.4.1. Efeito da adição de metanol por três vezes correspondente a 1/3 do valor estequiométrico .....	49
4.4.2. Efeito da adição de metanol por três vezes mas sem adição de água no início da reação .....	49

4.4.3. Efeito da adição de metanol todo de uma vez no início da reação .....	50
4.4.4. Efeito da adição de metanol todo de uma vez mas sem adição de água no início da reação.....	51
4.4.5. Efeito da adição de butanol todo de uma vez no início da reação .....	51
4.4.6. Efeito da adição de butanol todo de uma vez mas sem adição de água no início da reação.....	52
4.4.7. Efeito da adição de etanol todo de uma vez no início da reação .....	52
4.4.8. Efeito da adição de etanol todo de uma vez mas sem adição de água no início da reação.....	53

## **5. Conclusão .....54**

## **6. Bibliografia .....57**

## **Anexos.....66**

<b>Anexo I:</b> Resultados das reações do biodiesel com metanol lidas em HPLC .....	68
<b>Anexo II:</b> Resultados das reações do biodiesel com butanol lidas em HPLC .....	68
<b>Anexo III:</b> Resultados das reações do biodiesel com etanol lidas em HPLC.....	68

## Índice de Figuras

Figura 1. Reação química de transesterificação. Fonte: [106]

Figura 3.1 - Frasco de reação com tampa e agitador magnético usados nas reações de síntese do laureato de propilo e caproato de hexilo.

Figura 3.2. Frasco de titulação e agitador magnético utilizados no método titulométrico.

Figura 4.1 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cutinase O796G ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

Figura 4.2 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cutinase T171C ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

Figura 4.3 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cutinase 84 U.mol/ml.min ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

Figura 4.4 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cutinase wild-type Pura ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

Figura 4.5 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cal B ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

Figura 4.6 – Representação gráfica das percentagens de conversão do ácido capróico VS número de reutilizações (6) da Alumina (5 mg), nas condições operacionais de 30°C, agitação magnética de 200 rpm e durante 1 hora cada reação (7,5  $\mu$ l de hexanol e 6,25  $\mu$ l de ácido caproico sem água inicial). Alumina (250 mg) adsorvida a partir de 300  $\mu$ l da enzima Cutinase M3 concentrada.

Figura 4.7 – Representação gráfica das percentagens de conversão do ácido capróico VS número de reutilizações (29, 18 e 18, respetivamente) de suportes com cutinase imobilizada covalentemente metacrilato de epóxi butilo, metacrilato de epóxi e metacrilato de amina (10 mg cada), nas condições operacionais de 30°C durante 1 hora cada reação e com agitação magnética de 200 rpm (15  $\mu$ l de hexanol e 12,5  $\mu$ l de ácido caproico sem água inicial). Alumina (250 mg) adsorvida a partir de 300  $\mu$ l da enzima Cutinase M3 concentrada.

Figura 4.8 – Representação gráfica percentagens de conversão do ácido capróico suportes covalentes metacrilato de epóxi butilo e metacrilato de amina (10 mg cada) VS número de reutilizações (15 e 4 respetivamente). Reações efetuadas nas condições operacionais de 30°C 1 hora cada reação, agitação magnética de 200 rpm e durante (15  $\mu$ l de hexanol e 12,5  $\mu$ l de ácido caproico sem água inicial).

Figura 4.9 – Cromatograma com as zonas de tempo respectivas de substratos, intermediários e produtos. Retângulo preto (3 a 6 minutos) – zona temporal de detecção de ésteres, retângulo verde (6 a 10 minutos) – zona temporal de detecção de monoglicerídeos, retângulo castanho (10 a 15 minutos) – zona temporal de detecção de diglicerídeos, retângulo azul (17 a 22 minutos) – zona temporal de detecção de triglicerídeos. Gráfico de autoria própria.



## Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Exemplos de processos reacionais promovidos por enzimas imobilizadas covalentemente.

Tabela 2.2. Exemplos de processos reacionais promovidos por enzimas imobilizadas por adsorção

Tabela 3.1 - Parâmetros dos suportes hidrofóbicos: composição, tamanho da partícula, poro (volume) e área superficial

Tabela 3.2 - Parâmetros dos zeólitos: Razão Si/Al, tamanho da cristalite e abertura do poro

Tabela 3.3 - Parâmetros dos suportes iônicos: composição, tipo de resina, tamanho da partícula e entre outros. \* - macroporosa

Tabela 3.4 - Parâmetros dos suportes usados na imobilização covalentes grupo funcional e diâmetro do poro

Tabela 3.5 - Proporção de água na reação de síntese de laureato de propilo pela Cal B (v/v)

Tabela 3.6 - Proporção de água na reação de síntese de caproato de hexilo pela Cal B (v/v)

Tabela 4.1 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) da cutinase diluída com solução Tris-HCl 20mM (pH 8). Determinações efetuadas com variação temporal

Tabela 4.2 - Determinação da proteína total (mg/ml) da solução Tris-HCl 20 mM (pH 8) sobrenadante em contacto com as Cutinases e Cal B

Tabela 4.3 - Determinação da proteína total (mg/ml) do sobrenadante enzimático em contato com suportes hidrofóbicos ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), retiradas ao fim de 15 e 111 horas de adsorção. \* - Valor obtido fora da reta de calibração, A - suporte secou.

Tabela 4.4 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) do sobrenadante enzimático em contato com suportes hidrofóbicos ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), retiradas ao fim de 15 e 111 horas de adsorção. A - suporte secou.

Tabela 4.5 - Determinação da proteína total (mg/ml) do sobrenadante enzimático em contato com suportes inorgânicos (zeólitos e alumina) ( $\approx 100$  mg / 1 ml enzima), retiradas ao fim de 19 horas de adsorção. \* - Valor obtido fora da reta de calibração

Tabela 4.6 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) do sobrenadante enzimático em contato com suportes inorgânicos (zeólitos e alumina) ( $\approx 100$  mg / 1 ml enzima), retiradas ao fim de 19 horas de adsorção.

Tabela 4.7 - Determinação da proteína total (mg/ml) do sobrenadante enzimático em contacto com suportes iónicos ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), retiradas ao fim de 16 e 40 horas, a 150 rpm e a 25°C

Tabela 4.8 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) do sobrenadante enzimático em contato com suportes iónicos ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), ao fim de 16 e 40 horas, a 150 rpm e a 25°C

Tabela 4.9 - Determinação da proteína total (mg/ml) da solução de enzima (M3 com valores de pH corrigidos) e do sobrenadante enzimático em contato com suportes iónicos (com ajuste de pH) ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), retiradas ao fim de 16 e 40 horas, a 150 rpm e a 25°C. \* - Valor obtido fora da reta de calibração

Tabela 4.10 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) do sobrenadante enzimático em contato com suportes iónicos (com variação de pH) ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), ao fim de 16 e 40 horas, a 150 rpm e a 25°C

Tabela 4.11 - Determinação da proteína total (mg/ml) do sobrenadante enzimático em contato com suportes covalentes ( $\approx 50$  mg / 5 ml em cada período), em orbital e à temperatura ambiente. \* - Valor obtido fora da reta de calibração

Tabela 4.12 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) sobrenadante enzimático em contacto com suportes covalentes ( $\approx 50$  mg / 5 ml em cada período), em orbital e à temperatura ambiente

Tabela 4.13 - Determinação da proteína total (mg/ml) da mistura dos sobrenadantes enzimático após contato com o suporte covalente Metacrilato de epóxi butilo (1 g), em agitação orbital e à temperatura ambiente. Suporte contata por 3 ou 4 vezes com respetivos volumes de enzima e tempos de imobilização

Tabela 4.14 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) da mistura dos sobrenadantes enzimático após contato com o suporte covalente Metacrilato de epóxi butilo (1 g), em orbital e à temperatura ambiente. Suporte contata por 3 ou 4 vezes com respetivos volumes de enzima e tempos de imobilização

Tabela 4.15 - Determinação da conversão de ácido láurico não consumido durante 15 minutos, 1 e 21 horas a 50°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida nos suportes hidrofóbicos ( $\approx 10$  mg), Cal B ( $\approx 5$  mg) e Cutinase wild-type Pura ( $\approx 5$  mg)

Tabela 4.16 - Determinação da conversão de ácido láurico durante 15 minutos, 1 e 21 horas a 50°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida em suportes inorgânicos ( $\approx 10$  mg), Cal B ( $\approx 5$  mg) e Cutinase Pura ( $\approx 5$  mg)

Tabela 4.17 - Determinação da conversão de ácido láurico durante 1 hora a 50°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima (cutinase M3) adsorvida nos suportes iónicos ( $\approx 10$  mg), Lipase B ( $\approx 5$  mg) e Cutinase wild-type pura ( $\approx 5$  mg)

Tabela 4.18 - Determinação da conversão de ácido láurico durante 1 hora a 50°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela Lipase B ( $\approx 5$  mg) com diferentes teores de água

Tabela 4.19 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida nos suportes iônicos ( $\approx 100$  mg), com ajuste de pH

Tabela 4.20 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida nos suportes hidrofóbicos e inorgânicos ( $\approx 100$  mg)

Tabela 4.21 - Determinação da conversão de ácido capróico não consumido durante 1 hora, à temperatura ambiente (25°C) e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida nos suportes hidrofóbicos e inorgânicos ( $\approx 100$  mg)

Tabela 4.22 - Determinação da quantidade de ácido capróico não consumido 1, 12 e 24 horas, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida na Amberlite XAD-1180 e Alumina ( $\approx 100$  mg) e Cal B ( $\approx 5$  mg)

Tabela 4.23 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida na Alumina ( $\approx 100$  mg) com diferentes volumes de enzima cutinase (M3) adsorvida

Tabela 4.24 - Determinação da quantidade de ácido capróico não consumido durante 21 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima imobilizada na Alumina ( $\approx 100$  mg) com diferentes volumes de enzima cutinase (M3) adsorvida

Tabela 4.25 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida com atividade de água (AW) igual a 0,97 na Alumina ( $\approx 100$  mg)

Tabela 4.26 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 12 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima imobilizada com atividade de água (AW) igual a 0,97 na Alumina ( $\approx 100$  mg)

Tabela 4.27 - Determinação da conversão de ácido capróico não consumido durante 3, 5, 24 e 26 horas, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida com atividade de água (AW) igual a 0,97 na Alumina ( $\approx 100$  mg)

Tabela 4.28 - Determinação da conversão de ácido capróico não consumido durante 1, 3, 5, 20, 22, 24 e 26 horas, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida com atividade de água (AW) igual a 0,97 na Alumina ( $\approx 100$  mg)

Tabela 4.29 - Determinação da quantidade de ácido capróico não consumido durante 1 hora a 30°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela Cal B ( $\approx 5$  mg) com diferentes teores de água

Tabela 4.30 – Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5  $\mu$ l de metanol (1/3 adicionado a cada 4 horas) e 42,5  $\mu$ l de água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Tabela 4.31 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol (1/3 adicionado a cada 4 horas) sem água inicial. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Tabela 4.32 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e 42,5 µl de água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Tabela 4.33 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e sem água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Tabela 4.34 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol e 42,5 µl de água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Tabela 4.35 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e sem água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Tabela 4.36 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e 42,5 µl de água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Tabela 4.37 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e sem água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

# 1. Introdução

A imobilização de enzimas em suportes sólidos possui vantagens em processos catalíticos em meios convencionais e não-convencionais, revelando-se mais vantajosa neste último. Fatores físicos e químicos dos suportes e o próprio método de imobilização tem sido cada vez mais objeto de estudo, uma vez que estes influenciam a atividade e a estabilidade da enzima imobilizada.

Este trabalho tem como objetivo geral a utilização de suportes sólidos para a imobilização da enzima cutinase, biossintetizada por uma nova estirpe recombinante de *Escherichia coli*, estudando-se assim a sua capacidade de realizar eficientemente reações de esterificação e transesterificação, neste último caso, na síntese de biodiesel.

Neste trabalho, as reações de esterificação efetuadas tiveram como objetivo verificar a capacidade da cutinase livre e imobilizada em diferentes suportes de sintetizar ésteres utilizando como reagentes os ácidos gordos (láurico e capróico) e álcoois (propanol e hexanol), de forma a selecionar os melhores suportes e método de imobilização para posterior utilização na produção de biodiesel.

Os objetivos específicos foram:

- Imobilização por adsorção da cutinase em vários suportes com diferentes propriedades superficiais, tais como, hidrofóbicos, iônicos, inorgânicos e por ligação covalente.
- Estudar as condições ótimas de adsorção e imobilização da cutinase: quantidade de catalisador, teor de água, pH, temperatura e concentrações dos reagentes.
- Determinação da capacidade de esterificação dos diferentes suportes com cutinase imobilizada.
- Avaliar a estabilidade da enzima, por estudos de reutilização em reações de esterificação.
- Avaliar a capacidade de alguns biocatalizadores selecionados na síntese de biodiesel.



## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Biocatálise

Os biocatalisadores (catalisadores de origem biológica) realizam modificações/transformações específicas da estrutura molecular de substâncias, para tal, temos enzimas e células livres ou imobilizadas que apresentam propriedades catalíticas [1, 2]. A biocatálise pode ser efetuada em meio aquoso ou meio orgânico.

Em meio aquoso, as enzimas possuem a capacidade de catalisar reações em condições moderadas de temperatura e de pressão, reduzindo e minimizando assim a possibilidade de danos em substratos e/ou produtos, e excessivos gastos energéticos [3].

Em meio orgânico, podem ser mais eficientemente realizadas reações devido a restrições cinéticas ou termodinâmicas que não são possíveis em meio aquoso. As enzimas em meio orgânico apresentam maior estabilidade e devido à insolubilidade neste meio podem ser mais facilmente recuperadas, e reutilizadas [4].

#### 2.1.1. Catálise Enzimática

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza proteica, que devido à sua elevada eficiência catalítica e especificidade em condições operatórias suaves, pressão atmosférica, temperatura ambiente e pH próximo do neutro, faz com que tenham inúmeras aplicações [5].

Por isso, as enzimas têm sido utilizadas para a transformação e obtenção de novas classes de reagentes, açúcares, precursores quirais, metabolitos e componentes alimentares [6].

#### 2.1.2. Importância da água em catálise enzimática

As enzimas são biomoléculas anfipáticas, isto é, possuem regiões superficiais polares (hidrofílicas) e não-polares (hidrofóbicas), que mantêm as suas conformações estruturais através de interações intramoleculares entre cadeias laterais dos constituintes dos aminoácidos. Em meio aquoso as moléculas de enzima apresentam as suas regiões hidrofílicas em contato com a água, enquanto as regiões hidrofóbicas dobram-se para o interior da molécula, com o intuito de evitar a interação com a água. Quando esta é substituída por um solvente orgânico ocorre uma redução da polaridade do meio na vizinhança das moléculas de enzima, uma vez que as regiões hidrofóbicas são responsáveis pela dispersão, provocando assim a abertura e desenrolamento da estrutura tridimensional da proteína. Tendo isto em vista, as enzimas necessitam de uma camada de hidratação definida, de forma

a separar o solvente da superfície da proteína, contribuindo assim para o aumento da flexibilidade interna, conformação ativa e manutenção da sua estabilidade [3].

A disponibilidade da água também tem uma relevância termodinâmica determinante na competição entre as reações de síntese e de hidrólise [7], por isso o controlo do valor de atividade de água ( $a_w$ ) durante a reação é necessário, em especial, quando o consumo ou produção de água pela reação é relevante [8, 9].

### 2.1.3. Sistemas reacionais

As reações podem ser efetuadas tanto em meio aquoso, como orgânico ou na presença de ambos como nos sistemas macro heterogêneos, onde se pode observar separação de fases e nos sistemas micro heterogêneos, onde a separação de fases não pode ser observada a olho nu [10].

Nos sistemas macro heterogêneos encontram-se os sistemas bifásicos (líquido-líquido), (líquido-sólido) e sistemas trifásico (sólido-líquido-líquido). No sistema líquido-líquido a reação enzimática dá-se na fase aquosa onde se encontra a enzima ou na interface, como acontece com as lipases [11]. Enquanto no sistema líquido-sólido, o biocatalizador encontra-se imobilizado com a finalidade de proteger a enzima do contato direto com a interface água-solvente orgânico [12]. O sistema sólido-líquido-líquido é constituído por uma solução aquosa, um solvente orgânico e um suporte sólido, onde o biocatalizador (enzima) se encontra imobilizado [11].

Como exemplos dos sistemas micro heterogêneos, salientam-se as micelas invertidas que consistem em estruturas esféricas (1 - 10nm de diâmetro) formadas por moléculas de tensioativo (detergentes, fosfolípidos, etc) que se encontram posicionadas com a cadeia hidrocarbonada apolar para o exterior, em contato com o solvente orgânico e a parte polar para o interior [10, 11, 13, 14].

## 2.2. Imobilização de enzimas em suportes sólidos

As enzimas aquando da sua utilização encontram-se sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos [15]. Tendo isto em atenção, foram desenvolvidas técnicas de imobilização enzimática em diferentes suportes, onde as moléculas de enzima são confinadas a uma matriz/suporte sólido permitindo assim a reutilização destas, facilitando a separação dos produtos e aumento da estabilidade em meios aquosos e em solventes orgânicos. Da mesma forma, o método de imobilização não deve provocar modificações no centro ativo da enzima nem mudanças estruturais, por outro lado, a imobilização pode aumentar ou inibir a atividade e estabilidade enzimática [16]. Enzimas imobilizadas têm sido amplamente utilizadas na indústria alimentar, farmacêutica, têxtil e tratamento de águas residuais [17, 18].

De seguida são apresentadas algumas vantagens da utilização de enzimas imobilizadas [11, 17, 18, 19]:



- Estabilidade enzimática numa ampla gama de condições operacionais (pH, temperatura e a presença de substâncias competidoras ou inibidoras) [17 - 19];
- Utilização em condições operacionais ideais, sem perda considerável de atividade [17];
- Possibilidade de uso em sistemas reacionais em processos contínuo [18];
- Facilidade de recuperação das enzimas e reutilização destas, o que reduz assim o custo dos processos [17, 18];
- Retenção de água junto às moléculas de enzima, que é essencial para a manutenção da sua atividade [11].

Como principais desvantagens da utilização de enzimas imobilizadas salientam-se as seguintes possibilidades: [18]:

- Perda de atividade catalítica durante o processo de imobilização da enzima em conformação indesejada [18];
- Degradação mecânica e libertação de partículas pequenas no ato da separação física entre o catalisador e o meio reacional;
- Problemas de transferência de massa externos e internos [18].

### **2.3. Métodos de imobilização**

Os métodos de imobilização são bastante diversificados. Estes podem ser divididos em dois grandes grupos: métodos em que a enzima se encontra à superfície do suporte e métodos em que a enzima fica retida no interior da matriz de imobilização [11].

A imobilização de moléculas de enzima por ligação a um suporte é um dos métodos mais vastamente utilizado, uma vez que estas apresentam uma maior resistência a distorções e alterações conformacionais, demonstrando assim melhor estabilidade na presença de condições desfavoráveis [11]. Estes métodos podem ser divididos em três grupos, consoante o modo como se ligam à enzima: ligação iónica, ligação covalente e adsorção física.

#### **2.3.1. Ligação iónica**

As ligações iónicas têm por base as interações eletrostáticas entre os grupos carregados das moléculas de enzima e do suporte [20, 21, 22]. Quanto maior for a densidade de carga na superfície do suporte maior será a quantidade de enzima com carga contrária que se liga ao mesmo. A ligação enzimática durante a imobilização depende da concentração da enzima, temperatura e pH da solução [21].

Os suportes indicados para este tipo de interação são os permutadores iônicos derivados de polissacarídeos, polímeros sintéticos e materiais inorgânicos [21]. Permutadores catiónicos encontram-se carregados negativamente, isto é, atraem catiões que podem ser permutados por outros catiões. A condição inversa verifica-se para os permutadores aniônicos [22].

As enzimas são anfotéricas, pelo que possuem grupos ácidos e alcalinos. O pH da vizinhança influencia se a enzima se encontra protonada, dissociada ou sem carga [20].

Este método de imobilização leva a mínimas alterações na conformação da enzima. No entanto, é preciso uma manutenção da força iônica necessária e do pH da solução [23] em que a enzima imobilizada é envolvida em processos catalíticos, uma vez que existe uma maior possibilidade de a enzima se libertar do suporte em condições sub-ótimas resultantes de variação do pH no meio reacional [21].

### 2.3.2. Ligação covalente

Na ligação covalente os átomos são ligados por meio da partilha de pares de eletrões [20]. Estas ligações são formadas entre a enzima e o material utilizado com suporte, ocorrendo através dos aminoácidos de cadeia lateral, como histidina, lisina, arginina, cisteína ou ácido aspártico e glutâmico [16, 17]. Além disso os grupos funcionais hidroxilo, amino, carboxílico, imidazólico, indolílico e fenólico são também favoráveis para a formação deste tipo de ligações de acordo com a sua reatividade [16, 17]. A principal desvantagem da imobilização por ligação covalente está relacionada com inativação do centro ativo da enzima devido às reações químicas entre os resíduos de aminoácidos aí localizados e o suporte, o que leva a, uma diminuição nas atividades catalíticas [17]. A sua aplicação tem sido extensa, uma vez que a quantidade de enzima imobilizada pode ser controlada de forma mais acessível, resultando em complexos enzima-suporte relativamente resistentes às condições operacionais [20].

Outro método de ligação de enzimas por ligações covalentes, baseia-se na formação de ligações cruzadas entre grupos funcionais presentes na superfície do suporte [24] com os grupos funcionais dos aminoácidos presentes na enzima usando reagentes bi ou multifuncionais [17, 21]. Os reagentes frequentemente utilizados são isocianato, N, N'-etileno bis maleimida [17], glioxal, diisocianato de hexametileno, diisocianato de tolueno e glutaraldeído, sendo este último o mais usado [21]. A principal vantagem deste método é a sua simplicidade, todavia pode ocorrer perda de grande quantidade da atividade enzimática devido à não regulação da reação [21]. Além disto, este método de imobilização enzimática sofre limitações causadas pela difusão [21].

Alguns exemplos de reacções promovidos por enzimas imobilizadas por ligação covalente são apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Exemplos de processos reacionais promovidos por enzimas imobilizadas covalentemente

Reação	Enzima	Referências
Hidrólise	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	25
	Lipase de <i>Candida antarctica</i>	26
	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	29, 33
	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	33
Esterificação	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	25
	Lipase de <i>Candida antarctica</i>	26, 31
	Lipase de <i>Triacylglycerol acylhydrolase</i>	27
	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	29, 30
	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	30
Interesterificação	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	28
Transesterificação	Lipase de <i>Candida cylindracea</i>	6
	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	30, 33
	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	Lipase de <i>Candida antarctica</i>	32
	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	34

### 2.3.3. Adsorção física

A adsorção física de enzimas em suportes (ex: inorgânicos ou hidrofóbicos) é um outro método simples e conveniente para a imobilização de enzimas [17]. A enzima encontra-se ligada ao material do suporte por ligações de baixa energia, tais como, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações por pontes de hidrogénio e forças de van de Waals sem qualquer pré-ativação do suporte [16, 17, 20, 21]. As enzimas em solução podem ser absorvidas ao entrarem em contato com a superfície de um suporte, apresentando estas boas estabilidades, atividades e reduzida alteração conformacional [20].

Este método por um lado envolve a otimização de fatores como, pH, temperatura, natureza do solvente, força iônica, concentração de enzima e adsorvente [21], e por outro lado é influenciado pelo tamanho da enzima a ser adsorvida, área superficial do adsorvente, porosidade e tamanho do poro [16].

A principal desvantagem deste método consiste na possibilidade de ocorrer desorção da enzima durante a sua utilização ou após a lavagem da preparação do imobilizado devido a variações nos fatores acima mencionados [16, 35].

### 2.3.3.1. Técnicas de imobilização por adsorção

#### **Deposição**

Nesta técnica, a solução de enzima em tampão vai penetrar nos poros (se for suporte poroso) do suporte quando colocados em contato estático ou sobre agitação. O volume da solução aquosa utilizada deve ser suficiente para humedecer todas as partículas do suporte. O excesso de água deve ser posteriormente removido à temperatura ambiente por liofilização ou a pressão reduzida [25, 26, 36, 37]. Devido à solubilidade da enzima na solução usada e à capacidade de adsorção superficial do suporte, a quantidade de enzima imobilizada é mais ou menos limitada principalmente pelo tamanho dos poros do suporte [25, 36]. Como exemplo, a imobilização por deposição da lipase de *Candida rugosa* no suporte Celite [37].

#### **Precipitação**

Por precipitação, a enzima é obrigada a depositar-se sobre o material do suporte através da adição de água fria miscível com solventes orgânicos. Após o suporte se encontrar molhado com a quantidade de solução desejada, dá-se a adição de um excesso de solvente, o que leva à precipitação da enzima na superfície do suporte, visto que esta apresenta pouca solubilidade nestes solventes. A quantidade de solução aquosa é semelhante à necessária para a deposição. Na eventualidade de o suporte ser poroso é imperativo o preenchimento dos poros, de forma, a que a maior parte da enzima precipite no interior destes, tal é efetuado, através da adição da solução aquosa em quantidade suficiente. Técnica frequentemente usada quando os suportes são sensíveis à secagem. Depois da precipitação dá-se a remoção do sobrenadante e lavagem da preparação com solvente frio ou solvente da reação (sem secagem) [26, 38]. Como exemplo, a lipase de *Aspergillus* foi imobilizada em Celite por precipitação com acetona [39].

#### **Adsorção de forma restrita**

Técnica bastante utilizada para selecionar enzimas a partir de misturas impuras, resultando na imobilização simultânea e na parcial purificação da enzima adsorvida. Tendo em conta condições controladas de pH, temperatura e força iónica, as partículas do suporte são incubadas com a solução aquosa contendo a enzima (quantidade superior à utilizada para a imobilização por deposição). Quando é alcançado o equilíbrio de adsorção da enzima, procede-se à remoção do excesso de solução aquosa [26, 38].

Alguns exemplos de processos reacionais promovidos por enzimas imobilizadas por adsorção são apresentados na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Exemplos de processos reacionais promovidos por enzimas imobilizadas por adsorção

Reação	Enzima	Referências
Hidrólise	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	40
	Cutinase de <i>Aspergillus niger orizae</i>	43
	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	41
	Lipase de <i>Rhizopus arrhizu</i>	47
	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	
	Lipase de <i>Pseudomonas sp.</i>	
	Fosfolipases C	49
Esterificação	Lipase <i>Lipozyme</i>	9, 50, 51
	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	40
	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	41
	Lipase de <i>Rhizopus arrhizu</i>	47
	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	
	Lipase de <i>Pseudomonas sp.</i>	
	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	37
Interesterificação	Lipase de <i>Rhizopus arrhizu</i>	42
	Lipase de <i>Aspergillus</i>	39
	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	52
Transesterificação	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	34
	Lipase	44
	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	45
	Lipase de <i>Rhizopus arrhizu</i>	48
Síntese de dipéptidos	$\alpha$ -Chymotrypsin	36, 46

### 2.3.3.3. Importância da água

A existência de água no suporte tem um papel essencial na atividade e estabilidade enzimática, por isso é importante determinar a quantidade de água disponível para a enzima (hidratação da enzima), nomeadamente a forma como este elemento interage com o seu centro ativo [7, 53].

O perfil típico da atividade enzimática em função da hidratação da enzima apresenta um máximo correspondente ao valor ótimo de hidratação, abaixo e acima do qual a atividade da enzima decresce. Este perfil é influenciado pelo tipo de suporte quando a enzima está imobilizada e do próprio tipo de enzima. Na fase inicial de hidratação, o aumento da água ligada à enzima tem um efeito benéfico a nível da flexibilização da mesma e do centro ativo, em particular, podendo funcionar com menos de uma monocamada de água por molécula de enzima. Contudo, a presença de elevada quantidade de água pode facilitar a agregação da enzima ou dificultar o acesso de substratos ou produtos de e para o centro ativo da mesma, o que provoca, normalmente uma redução da atividade [7].

Níveis elevados de água disponível para a enzima podem ainda conduzir à desnaturação da mesma [7]. Por esta razão é que se revela essencial a escolha de um suporte adequado, caracterizado por uma apropriada relação água - atividade [54].

Tendo isto em vista, revela-se importante determinar, estabelecer e controlar um valor ótimo de atividade de água ( $a_w$ ) para o sistema reacional não-convencional [8, 55, 56]. Conseguir-se fixar um determinado  $a_w$  através do contato com a fase de vapor de soluções saturadas de sais de  $a_w$  conhecidas [57].

## 2.4. Suportes

### 2.4.1. Zeólitos

Os zeólitos a nível estrutural são silicoaluminatos cristalinos, isto é, os seus elementos estruturais da base são tetraedros  $[\text{AlO}_4]^-$  e  $[\text{SiO}_4]$  interligados entre si por átomos de oxigénio, dando assim origem a uma rede microporosa. Diferentes estruturas cristalinas originam diferentes arranjos dos tetraedros de base. Os tetraedros  $[\text{AlO}_4]^-$  possuem cargas negativas na sua estrutura que são compensadas com cátions que se encontram presentes em diversos locais no interior da estrutura porosa [58]

Tendo em conta o número de átomos de oxigénio (anéis de 18, 12, 10 ou 8 átomos) que forma as aberturas dos poros, os zeólitos podem ser classificados em zeólitos de poro pequeno, médio, largo e extralargo [58].

Os zeólitos são caracterizados pela sua alta propensão à hidratação, estrutura cristalina estável quando desidratada, troca de cátions, propriedades catalíticas e de sorção [59].

Os zeólitos possuem uma ampla faixa de aplicações, sendo comumente utilizados para a catálise, a purificação de água e remoção de metais pesados tóxicos [60].

Alguns exemplos de processos reacionais promovidos por enzimas imobilizadas em zeólitos são apresentados na tabela 2.3.

Tabela 2.3. Exemplos de processos reacionais promovidos por enzimas imobilizadas por adsorção

Reação	Enzima	Referências
Hidrólise	Cutinase de <i>Fusarium solani pisi</i>	11, 63
Alcoólise	Cutinase de <i>Fusarium solani pisi</i>	63, 64
Esterificação	Lipase de <i>Candida antarctica</i>	65
	Lipase Novozyme 435	66
Transesterificação	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	67
	Cutinase de <i>Fusarium solani pisi</i>	62
	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	61

A vantagem da utilização dos zeólitos como suportes para a imobilização de enzimas é o facto destes materiais estarem muito bem caracterizados e assim permitir perceber a influencia das propriedades da interação suporte enzima [63].

#### 2.4.2. Suportes de resinas sintéticas

Ínúmeros materiais poliméricos podem ser utilizados como suportes eficazes para melhorar a estabilidade térmica e reutilização das enzimas imobilizadas, que se revelam importantes na proteção dos centros ativos da enzima contra os efeitos negativos dos componentes do meio reacional e das condições operacionais [73]. Os monómeros presentes em cadeias poliméricas de polímeros sintéticos podem ser especificamente selecionados tendo em conta a enzima e processo em que o produto de imobilização será utilizado [68, 69]. O tipo, quantidade e composição dos monómeros determinam a estrutura química, propriedade do polímero e afeta determinados fatores, tais como: solubilidade, porosidade, estabilidade e propriedades mecânicas do polímero. Na estrutura dos polímeros podem-se encontrar grupos funcionais químicos, como por exemplo, grupos carbonilo, carboxilo, hidroxilo, epóxi, amina e diol, assim como grupos fortemente alquilo hidrofóbicos [70, 71]. Estes grupos funcionais facilitam uma eficaz ligação enzimática e funcionalização da superfície do polímero, por essa razão, o tipo de grupo determina a forma como a enzima é ancorada à matriz por meio de, por exemplo, adsorção ou pela formação de ligações covalentes, uma vez que são as formas de imobilização comumente utilizadas em suportes poliméricos sintéticos [71]. O carácter hidrofóbico/hidrofílico da matriz é determinado pelo tipo e quantidade de grupos funcionais presentes nesta [72].

Polímeros diferentes com vários grupos funcionais têm sido utilizados para imobilização enzimática. Por exemplo, a  $\alpha$ -amilase foi imobilizada covalentemente em polianilina através dos grupos -NH, ao passo que a tirosinase foi imobilizada através dos grupos -NH e ligação dupla C = O na poliamida 66 sem quaisquer ligantes [74, 75]. Outro exemplo é uma lipase comercial que foi imobilizada covalentemente em microesferas de poliestireno que possuem uma forte interação hidrofóbica e são ativadas por grupos epóxi [76].

### 2.5. Cutinase

#### 2.5.1. Origem

A cutinase, um membro menor das enzimas da família da serina hidrólase ( $\alpha / \beta$ ), é induzida pela cutina (componente estrutural da cutícula que cobre os vegetais superiores), possui propriedades funcionais dupla de esterase e lipase [11, 77, 78]. A cutícula encontra-se ligada à parede das células epidérmicas dos vegetais por uma camada de pectinas e tem como principais funções proteger e evitar a secagem dos tecidos subjacentes [79]. Cutinase é constituída pela cutina, que é a matriz de poliéster insolúvel [11, 78] cujos monómeros são basicamente constituídos por ácidos gordos (16 a 18 átomos de carbono) com grupos substituintes hidróxilo, cetona, aldeído ou epóxido [80].

Esta enzima está envolvida em reações de hidrólise e esterificação de inúmeros polímeros biodegradáveis (solúveis ou insolúveis), análogos da cutina (o seu substrato natural) e cadeias longas de triglicerídeos (exemplos, tricaprilina e trioleína) [77, 78]. A cutinase não é apenas estável e ativa em meio aquoso, e em interface água-lípido, mas também apresenta atividade em triglicerídeos solúveis e emulsionados. Todavia, o seu uso é restrito devido à menor estabilidade térmica [77].

Fungos fitopatogénicos ou esporos fúngicos excretam para o exterior da célula cutinases que, ao degradarem a cutina, permitem a sua penetração e infeção da planta [56]. A maioria das cutinases produzidas a partir de fontes fúngicas é suscetível a processos de desnaturação a temperaturas acima de 45°C [77].

Como os fungos são patogénicos a produção não pode acontecer em larga escala, por essa razão é que se tentou identificar o gene e por modificação genética produzir-se em *Escherichia coli*.

#### 2.5.2. Clonagem e expressão da cutinase

O gene que codifica para a isoenzima cutinase foi identificado e após a construção de um banco de cDNA de acordo com o descrito por Soliday [81]. O gene foi clonado em *Escherichia coli* sob o controlo do promotor  $P_{tac}$  induzível pelo IPTG (iso-propilo beta-D-galactosídeo), pela CORVAS International N. V., Gent Bélgica [82]. Neste trabalho foram utilizadas duas cutinases, ambas produzidas em estirpes recombinantes de *E. coli*, mas uma com o seu gene hibridado com o sinal peptídico para a excreção da fosfatase alcalina, dando-se a sua acumulação no espaço periplasmático [11], e a outra excretada para o exterior da bactéria [83, 84]. As enzimas recombinantes possuem mais quinze aminoácidos do que enzimas produzidas via fúngica, introduzidos no resíduo N-terminal de maneira a promover um local de clivagem adequado a um organismo procariota [11, 82].

O procedimento de purificação da cutinase recombinante que se encontra no espaço periplasmático da *E. coli*, consiste em aplicar choque osmótico, seguido de uma precipitação ácida e dois passos de cromatografia de troca aniónica: DEAE celulose e Q-Sepharose [11]. A nova estirpe expressa e excreta a cutinase para o meio extracelular, e pode ser purificada por só com um único passo cromatográfico [84].

As cutinases recombinantes usadas neste trabalho possuem um peso molecular de 22000 Daltons, um ponto isoelétrico de cerca de 7,8, são regioseletiva para a posição Sn-3 de triglicéridos e é estereoseletiva para o enantiómetro R em análogos sintéticos de triacilgliceróis [11].

#### 2.5.3. Comportamento das esterases e lipases da cutinase

Esterases, lipases e cutinases têm em comum o fato de possuírem o centro ativo constituído pela tríade catalítica, serina 120, histidina 188 e aspartato 175 [11].



A cutinase apresenta um centro ativo com elevada flexibilidade o que poderá resultar, numa possível maior de adaptação a diferentes tipos de substratos em que esta enzima é capaz de atuar. Sendo assim, a cutinase apresenta atividade catalítica em substratos como a cutina, ésteres de ácidos gordos e triacilgliceróis de variados tamanhos de cadeia, possuindo, no entanto, uma maior especificidade para cadeias curtas. A cutinase ao hidrolisar substratos tanto na forma monomérica como na forma de agregados estabelece a conexão entre as esterases e lipases que atuam em monómeros e em agregados, respetivamente [11].

As esterases atuam sobre ésteres em solução, pelo que a sua atividade não aumenta acima da concentração saturante de substrato. Contrariamente, as lipases aumentam muito a sua atividade quando atuam sobre agregados do substrato [85].

As esterases possuem o centro ativo acessível ao substrato, logo, a sua atividade sob os monómeros de substrato é incrementada porque estes acedem livremente ao centro ativo, ao passo que, nas lipases é necessária a presença de uma interface para tornar o centro ativo acessível [86].

Em meios não-convencionais a cutinase encontra-se igualmente funcional, em meios bifásicos como micelas invertidas com os tensioativos CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamónio) ou AOT (bis-(-2-etilhexil)sulfossuccinato de sódio) em solvente orgânico (ex: isooctano), após imobilização por ligação covalente ou adsorção [62] a suportes sólidos [11].

Devido à flexibilidade da atividade biocatalítica da cutinase em vários substratos, esta encontra aplicações crescentes, na indústria de laticínios (hidrólise da gordura do leite), óleos, indústria óleo-química (síntese de ingredientes ativos de detergentes necessários diariamente, surfactantes e triglicerídeos estruturais), indústria de cosméticos (síntese de ingredientes para produtos de cuidado pessoal), setor farmacêutico, alimentício e agrícola (separação de enantiómeros quirais, ésteres síntese) [78].

A cutinase tem sido utilizada como biocatalisador, nomeadamente em reações de hidrólise [11, 43, 62, 63], esterificação [87, 88] e transesterificação [62, 88, 89], tendo sido utilizada de inúmeras formas. Pode encontrar-se microencapsulada, liofilizada, modificada quimicamente e imobilizada por ligação covalente, por adsorção ou por aprisionamento em método de oclusão [20].

## **2.6. Biodiesel**

Os biocombustíveis como fonte de energia renovável são elementos essenciais do sistema energético mundial futuro. Estes podem diminuir a dependência dos combustíveis fósseis e consequentemente as emissões associadas ao seu uso [90, 91]. Este composto nos setores da energia e dos transportes apresenta uma elevada importância, visto que pode resolver problemas energéticos e substituir parcialmente de forma eficiente o diesel proveniente do petróleo [92]. Tendo isto em vista, é relevante a realização de mais estudos de maneira a encontrar soluções para aumentar a produção de biocombustíveis [62, 93]. Estes passaram por três fases: biocombustíveis de primeira, de segunda e de terceira geração.

Biocombustíveis de primeira geração são produzidos pela transesterificação de óleos comestíveis (grãos de soja, milho e cana de açúcar) com bioetanol, obtido a partir da fermentação e destilação da cana-de-açúcar. Biocombustíveis de segunda geração são produzidos usando matéria-prima não comestível (exemplo, sementes) e bioetanol, formado este a partir da biomassa lenhocelulósica. Biocombustíveis de terceira geração são produzidos utilizando óleo extraído de microalgas. O biodiesel pode então ser produzido por via química ou biológica, na primeira podemos ter catálise ácida ou básica, enquanto na segunda temos catálise enzimática.

### 2.6.1. Reações para produção do biodiesel

Este composto pode ser obtido por diferentes processos, tais como, cracking térmico e/ou catalítico, esterificação e transesterificação.

#### **Cracking térmico e/ou catalítico**

O método de cracking térmico e/ou catalítico consiste na quebra de triglicerídeos [94, 95] presentes no óleo, levando assim à formação de uma mistura de hidrocarbonetos semelhantes ao biodiesel tradicional e de compostos oxigenados [95, 96]. Comparativamente com o processo de transesterificação, este método apresenta menor custo de operação, uma vez que resíduos (com alta ou baixa pureza) podem ser utilizados como matéria-prima [97]. Tendo em conta a semelhança das propriedades físico-químicas deste método com o combustível fóssil, revela-se possível o uso direto do composto produzido por este método em motores a diesel [96]. Como exemplos, a utilização de óleos vegetais [98, 99], óleo residual [99] e resíduos de gordura presentes em filtros de gordura [100].

#### **Esterificação**

O método de esterificação consiste na reação de um ácido gordo com um monoálcool para formar ésteres, ocorrendo esta reação na presença de catalisadores ácidos [94]. Com este método apenas se forma água como subproduto, que é facilmente removida posteriormente, o que se traduz numa vantagem. [94]. Vários trabalhos têm apresentado a reação de esterificação como forma de produção do biodiesel [101-103].

#### **Transesterificação**

A transesterificação é o principal método para a produção de biodiesel [104], aqui a reação ocorre entre um óleo (mistura de triglicerídeos) e um álcool, levando à formação de ésteres alquílicos e glicerol [105], normalmente é adicionado um catalisador com a finalidade de acelerar a velocidade da reação [62]. A seguinte figura mostra a reação química envolvida neste método.

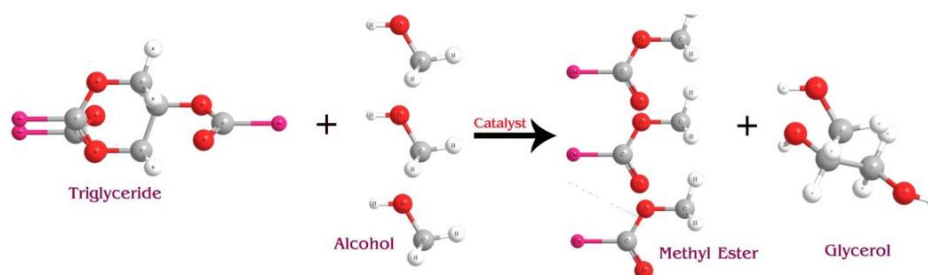


Figura 1. Reação química de transesterificação. Fonte: [106].

A transesterificação de triglicéridos pode ser feita usando catalisadores químicos ou enzimáticos em sistemas reacionais [104]. Caso o catalisador se encontre na mesma fase durante a transesterificação, é designada de transesterificação catalítica homogênea ou em fase diferente (por exemplo, sólido, líquido imiscível ou gasoso) a transesterificação catalítica é heterogênea [62].

Na transesterificação catalítica homogênea, os catalisadores químicos encontram-se divididos em catalisadores básicos e ácidos. Para este processo é necessária a existência de matéria-prima com elevado grau de pureza e que haja uma separação completa do produto, subproduto e do catalisador no final da reação, afetando assim o custo de produção do biodiesel [62]. Os catalisadores homogêneos básicos (exemplos, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio) possuem uma condição de operação moderada, disponibilidade, custo-eficácia, alta atividade e eficiência de conversão [62, 107]. Utilizando catalisadores homogêneos ácidos (exemplos, ácido sulfúrico ou ácido clorídrico) [104] a transesterificação começa misturando o óleo diretamente com o álcool acidificado, portanto a separação e a reação ocorrem de uma só vez com o álcool atuando concorrentemente como solvente e reagente de esterificação. Catalisadores homogêneos funcionam de forma muito eficiente, no entanto a sua recuperação é dificultada após o processo reacional [62].

Em transesterificação catalítica heterogênea os catalisadores atuam em uma fase diferente da mistura de reação, por esta razão, podem ser facilmente separados e reutilizados [62]. Estes catalisadores, permitem reduzir os custos de produção, garantem uma maior eficiência e lucratividade, e a recuperação do catalisador como já foi acima mencionado [108, 109].

Na transesterificação enzimática, temos a produção de biodiesel utilizando biocatalisadores (enzimas), estes apresentam uma alta especificidade, não possuindo restrições relativamente à qualidade da matéria-prima, geram uma menor quantidade de efluente aquoso [110], possuem uma baixa temperatura reacional evitando assim elevados custos energéticos, etapas como a neutralização e lavagem do biodiesel são desnecessárias, e o glicerol formado é facilmente removido com alto grau de pureza [91,110]. A reação envolve dois substratos, podendo ser definida por um mecanismo do tipo ping-pong ou sequencial. Estes mecanismos baseiam-se na libertação de um ou mais produtos antes de os dois substratos reagirem e na

combinação dos substratos com a enzima antes de ocorrer a reação, e a liberação do(s) produto(s), respectivamente. Todavia existem inconvenientes à utilização de enzimas na produção de biodiesel, tais como, maiores tempos reacionais, possibilidade de desativação do biocatalisador e o alto custo dos mesmos [110].

#### 2.6.2. Aplicações do biodiesel

De seguida são apresentadas algumas aplicações do biodiesel:

- Como solvente: pode ser utilizado como solvente industrial, conduzindo assim à substituição de solventes de petróleo com alta VOC (formação de compostos orgânicos voláteis) [111].
- Como aditivo de combustível: pode ser usado como um aditivo ao combustível convencional a diesel, com o objetivo de manter injetores, bombas e outros componentes de combustão limpos [111, 112].
- Como combustível para veículos [111, 112].

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Suportes

Os suportes hidrofóbicos utilizados foram as Amberlite XAD – 2, 4, 7 e 1180, fornecidas pela Rohm and Haas (França). O suporte XAD - 16 foi fornecido pelos Laboratórios Chauny (França). O DIAION HP20 foi fornecido pela Lenntech (Holanda).

As formas sódicas dos zeólitos A e X, NaA e NaX, e o zeólito CaA, que correspondem respetivamente às designações comerciais 4A, 13X e 5A, foram fornecidas pela Aldrich (Alemanha). A forma sódica do zeólito Y, NaY foi fornecida pela Union Carbide (EUA). A alumina (Pural SB, alfa-Alumina monohidratada) tinha sido fornecida pela Condea (Alemanha) e encontrava-se disponível no laboratório.

As resinas catiónicas Dowex 50W – X8 e AG 50W – X2, X8 foram fornecidas pela BDH Chemicals (Inglaterra) e BIO – RAD (EUA), respetivamente. As resinas aniónicas Amberlite IRA – 400 e 458 foram fornecidas pela Aldrich (Alemanha) e Rohm and Haas (França), respetivamente.

Os suportes metacrilato de epóxi butilo (ECR8285), metacrilato de epóxi (ECR8204F) e metacrilato de amina (ECR8309F) foram fornecidos pela Lifetech (Portugal).

As características dos suportes encontram-se listados nas tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4.

Tabela 3.1 - Parâmetros dos suportes hidrofóbicos: composição, tamanho da partícula, poro (volume) e área superficial

Suportes Hidrofóbicos	Composição (Matriz)	Tamanho da partícula (malha)	Tamanho do poro (Å)	Volume do poro (ml/g)	Área de superfície (m <sup>2</sup> /g)
Amberlite XAD-2	Estireno - divinilbenzeno (macroreticular)	20 - 60	90	≈ 0.65	≈ 300
Amberlite XAD-4	Estireno - divinilbenzeno	20 - 60	100	≈ 0.98	750
Amberlite XAD-7	Acrílico	20 – 60 equivalente 560 - 710 µm	300-400	0.5	380
Laboratoires Chany XAD-16	Estireno - divinilbenzeno	20 – 60 equivalente 560 - 710 µm	200	≈ 0.55	800
DIAION HP20	Estireno - divinilbenzeno	250 - 850 µm	260	≈ 1.30	≈ 500
Amberlite XAD-1180	Estireno / divinilbenzeno poliaromático	20 - 60	300	1.68	600

Tabela 3.2 - Parâmetros dos zeólitos: Razão Si/Al, tamanho da cristalite e abertura do poro

Suportes inorgânicos	Razão Si/Al	Tamanho da cristalite (µm)	Abertura do poro (Å)
Zeólito NaA	1	1 – 2	3,8 – 4
Zeólito NaX	1,5	1 – 2	7,4
Zeólito CaA	1	1 – 2,5	4,3 – 4,5
Zeólito NaY	2,7	0,5 - 1	7,4

Tabela 3.3 - Parâmetros dos suportes iônicos: composição, tipo de resina, tamanho da partícula e entre outros. \* - macroporosa

Suportes Iônicos	Composição (Matriz)	Tipo de permuta da resina	Forma iônica	Tamanho da partícula (µm)	Volume do Poro (m <sup>2</sup> /g)
Dowex 50W-X8	Estireno - divinilbenzeno (gel)	Catiónica (-)	Hidrogénio	16 - 50	-
AG 50W-X8	Estireno - divinilbenzeno	Catiónica (-)	Hidrogénio	20 - 50	-
AG 50W-X2	Estireno - divinilbenzeno	Catiónica (-)	Hidrogénio	200 - 400	-
Amberlite IRC 50	Estireno	Catiónica (-)	Sódio	330 - 500	2*
Amberlite IRA-400	Estireno	Aniónica (+)	Cloro	400 – 550	2*
Amberlite IRA-458	Estireno	Aniónica (+)	Cloro	400 - 550	2*

Tabela 3.4 - Parâmetros dos suportes usados na imobilização covalente: grupo funcional e diâmetro do poro

Suportes Covalentes	Grupo Funcional	Diâmetro do Poro (Å)
Metacrilato de epóxi butilo	Epóxi	400 – 600
Metacrilato de epóxi	Epóxi	300 – 600
Metacrilato de amina	NH <sub>2</sub>	600 - 1200

### 3.1.2. Enzimas

As enzimas disponíveis e utilizadas durante a realização deste trabalho foram cutinases liofilizadas (armazenada a -20°C) de *Fusarium solani pisi* geneticamente modificadas (O796G, T171C, 84 U.mol/ml.min) e wild-type pura biossintetizadas e acumuladas no espaço periplásmico por estirpes recombinante de *Escherichia coli*. Em alternativa, foi estudada uma nova cutinase de *Fusarium solani pisi* biossintetizada por uma nova estirpe recombinante de *Escherichia coli*, mas que expressa e excreta simultaneamente a cutinase para o meio de cultura (pH 7.2). As soluções enzimáticas (M3, J1 e J2) disponíveis e testadas principalmente durante este trabalho, foram obtidas após separação das células bacterianas por centrifugação (SORVALL RC6). As soluções enzimáticas (M3 e J2) foram também concentradas e diafiltradas em membrana da Romicon (1 m<sup>2</sup>) de exclusão molecular de 5,000 Dalton antes de realizar os ensaios de imobilização da cutinase nos diferentes suportes [59, 104].

A lipase comercial Cal B (ChiralVision) foi usada em alguns ensaios realizados como enzima de comparação.

### 3.1.3. Reagentes usados nos ensaios experimentais

Os reagentes usados são apresentados de acordo com a técnica analítica ou reação em que foram usados.

Na determinação da atividade estereolítica das enzimas livres pelo método de para-nitrofenilbutirato (p-NPB) foram usados: p-NPB, 98% pureza (Sigma Aldrich), acetonitrilo, 99;99% (Fisher Scientific), Tampão Tris (Eurobio) e ácido clorídrico, 37% (Riedel-de Haën).

Na determinação da proteína total (Método de Bradford): Tampão Tris (Eurobio), ácido clorídrico, 37% (Riedel-de Haën), solução de Bradford (Alfa Aesar) e Albumina de Soro Bovino Fracção V (BSA) (Nzytech) como proteína padrão.

Na imobilização da cutinase pelo método de ligação covalente do suporte (metacrilato de amina) funcionalizado com grupo amina com glutaraldeído: glutaraldeído em solução aquosa 25 % mássica (Acros Organics).

Na reação de síntese do laureato de propilo: ácido láurico, 99% pureza (Acros Organics), 1-propanol, min. 99,5% de pureza (Lab-Scan Analytical Sciences) e água destilada Milli Q-Integral.

Na reação de síntese do caproato de hexilo: ácido capróico, 98% pureza (Fluka Analytical), 1-hexanol, 98% pureza (Fluka Chemical) e água destilada Milli Q-Integral.

As preparações de atividade de água controlada: Sulfato de potássio (Scharlau) e água destilada Milli Q-Integral.

Preparação das amostras antes da sua injeção e leitura em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): n – Hexano (Fisher Scientific), ácido acético (Panreac).

Eluição das amostras em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): água destilada Milli Q-Integral, acetonitrilo (Fisher Scientific), 2-propanol (Fisher Scientific) e n – Hexano (Fisher Scientific).

### **3.2. Equipamentos**

Para o processo de imobilização de suportes hidrofóbicos e suportes inorgânicos foram utilizadas bombas de vácuo da KNF Neuberger e da KNF LAB LABOPORT. Com a primeira, a secagem não foi completa, enquanto que com a segunda conseguiu-se obter os imobilizados secos. Para os suportes iónicos foi utilizada uma incubadora da Aralab.

Para a determinação de proteína foi utilizada um leitor de placas SpectraMax 340PC da Molecular Devices.

Para a determinação da atividade enzimática estereolítica utilizou-se o espectrofotómetro Hitachi U – 2000, o agitador eletrónico modelo 300 da Rank Brothers LTD para mover o pequeno magneto dentro da cuvette de 3 ml e o controlador de circulação de aquecimento Thermomix MM da B. Braun para termoelestatizar a cuvette.

Para a preparação de amostras enzimáticas foi utilizado uma centrífuga de bancada da VWR International para eliminar algum precipitado e assim, obter um sobrenadante clarificado antes da imobilização das enzimas.

No equilíbrio das preparações enzimáticas com a atividade de água controlada foram utilizadas estufas de temperatura controlada da Memmert e Grant Bio.

Para a realização das reações de síntese do laureato de propilo foi utilizada a incubadora com agitação magnética da J.P. Selecta, enquanto que para as reações de síntese do caproato de hexilo foram utilizadas duas incubadoras, uma com agitação magnética da J.P. Selecta e outra com agitação orbital da Aralab.

Para a determinação do ácido não convertido nas reações de síntese do laureato de propilo e caproato de hexilo por titulação foi utilizada uma placa de agitação magnética da Ikamag Geo e uma bureta da Polix.

As reações de esterificação e síntese de biodiesel ocorreram em vials de vidro (~5ml) disponíveis no laboratório.

Para as reações de síntese do biodiesel foi utilizado uma incubadora com agitação magnética da J.P. Selecta.

Para a leitura das amostras em HPLC foi utilizado o equipamento Hitachi Autosampler L-2200 (ELITE LACHrom) com a coluna RP18 (Merck KGaA).



### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Métodos de Imobilização

A cutinase foi imobilizada por adsorção nos suportes hidrofóbicos, inorgânicos e iônicos seguida ou não por reticulação com glutaraldeído e, em alternativa, por ligação covalente com suportes comerciais de matriz em metacrilato e funcionalizados com grupos epóxi, epóxi butilo e amina.

Na adsorção da cutinase foi pesado 500 mg de cada suporte hidrofóbico (Amberlite XAD – 2, 4, 7 e 1180 e XAD – 16) para copos de plástico opacos. Os suportes foram previamente lavados com etanol a 96% e depois com água antes de serem secos à temperatura ambiente. Em seguida juntou-se 5 ml da solução de cutinase M3 e as preparações foram colocadas num exsiccador ligado a uma bomba de vácuo (KNF Neuberger) para evaporação e redução da quantidade de água.

No segundo grupo de experiências foi colocado na proporção de 100 mg de cada suporte inorgânico (NaA, NaX, NaY, CaA, NaY e alumina) em copos de plástico opacos, 1 ml de solução de cutinase M3, colocando-se de seguida num exsiccador ligado a uma bomba de vácuo (KNF Neuberger).

Foi utilizada outra bomba de vácuo (KNF LAB LABOPORT) onde foi possível a secagem das amostras obtidas com as proporções de 250 mg de alumina e 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 ml de solução de cutinase M3.

A imobilização em suportes iônicos (Dowex 50W – X8, AG 50W – X2, X8 e Amberlite IRA – 400 e 458) foi efetuada pela adição de 500 mg de suporte e 5 ml de solução de cutinase M3. De seguida as amostras foram colocadas numa incubadora (Aralab) à temperatura ambiente (25°C) e agitação orbital a 150 rpm durante tempos variados. Em algumas amostras selecionadas (Dowex 50W – X8, AG 50W – X2 e X8) foi feita a imobilização com variação de pH entre 2 – 4 e 4,5 – 5, através da junção de HCl.

As amostras de biocatalisadores obtidos por ligação covalente da cutinase foram realizadas com três tipos de suportes (<https://www.purolite.com/dam/jcr:d232619d-bb23-4424-ac5a-2fc3c219701e/Lifetech%20ECR%20immobilization%20procedures%20web%20Mar2017.pdf>) Foram pesados suportes com grupo epóxi e epóxi butilo, e com grupo amina 50 mg de cada suporte e lavados 3 vezes com 5 ml do tampão fosfato 100 mM (suportes metacrilato de epóxi e metacrilato de epóxi butilo) e 25 mM (suporte metacrilato de amina) ambos a pH 6,9. Após as lavagens os suportes com grupo epóxi e epóxi butilo encontravam-se prontos para a imobilização, enquanto o com grupo amina, carecia ainda da ativação do grupo amina, o que se conseguia utilizando 200 µl glutaraldeído a 2%, durante 1 hora, com agitação e à temperatura ambiente. Estes suportes metacrilados com grupos de epóxi, epóxi butilo e amina ativada com glutaraldeído foram então usados na imobilização da cutinase, adicionando-se 5 ml da solução de cutinase M3 e sob agitação durante 2 horas à temperatura ambiente. Ao fim das duas horas foi retirado o sobrenadante, a parte líquida em contato com o suporte e colocados mais 5 ml da solução de cutinase M3 deixando agora em contacto durante a noite.

Num segundo grupo de experiências, a cutinase foi imobilizada no suporte com grupo epóxi butilo à temperatura ambiente. 1 g deste suporte foi pesado e lavado 3 vezes com 20 ml do tampão fosfato 100 mM, pH 6,9. Posteriormente foi colocada a enzima a imobilizar durante 4 rondas, 3 de 1 hora e a última deixada durante a noite. As duas primeiras rondas de imobilização foram efetuadas cada uma com 25 ml da cutinase M3 (265 U/ml), sendo as duas últimas com 25 ml da cutinase do J1 (134 U/ml). Com o fim de cada ronda era retirado o sobrenadante e colocado um novo volume da solução da mesma enzima.

Num terceiro grupo de experiências, a enzima foi imobilizada no mesmo suporte, tendo sido pesado 1 g e lavado 3 vezes com 20 ml do tampão fosfato 100 mM, pH 6,9. De seguida foi colocada a imobilizar a enzima durante 3 rondas, 2 de 2 horas e a última deixada durante a noite. Todas as rondas de imobilização foram efetuadas com 20 ml da cutinase do J2 (360 U/ml). No fim de cada ronda era retirado o sobrenadante e colocado novo volume da solução da enzima.

### 3.3.2. Preparações de suportes com enzima imobilizada com atividade da água ( $a_w$ ) constante

As preparações da enzima (M3 e M3 concentrado) imobilizada foram colocadas em recipientes fechados, em contato com a fase de vapor da solução saturada do sal sulfato de potássio com atividade de água,  $a_w$ , de 0,97, à temperatura de 30°C, na proporção de 200 mg do sal / 250 ml de água [2, 3].

De acordo com estudos anteriores [63], o tempo ideal para a obtenção do  $a_w$  fixo é de 3 a 4 dias, até se obter uma massa contante, pelo que foi verificado o peso das amostras até se obter peso constante.

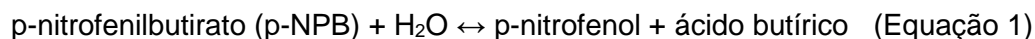
### 3.3.3. Determinação da proteína

#### Método Bradford

A concentração de proteína solúvel foi determinada utilizando o método de Bradford, o qual se baseia na interação do reagente de Coomassie com as ligações peptídicas das proteínas solúveis. A reta de calibração foi feita a partir de uma solução concentrada de BSA (1,6 mg/ml) em Tris-HCl (20 mM, pH 8), os padrões usados foram 0; 0,064; 0,096; 0,16; 0,2; 0,24 mg/ml por diluição com Tris-HCl (20 mM, pH 8). A cada 50  $\mu$ l de amostra do sobrenadante de enzima em contacto com os suportes foi adicionado 100  $\mu$ l do tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8), 150  $\mu$ l do corante coomassie e esperando-se 10 minutos à temperatura ambiente antes de ler a absorvância a 595 nm.

### 3.3.4. Determinação da atividade enzimática

#### Reação de hidrólise



A atividade estereolítica foi determinada com a reação de hidrólise do p-nitrofenilbutirato (p-NPB). Em cada cuvette com um agitador magnético foram adicionados 1470 µl do tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8), 15 µl da solução de enzima pura ou diluída (previamente misturada utilizando um vortex) e 15 µl da solução stock de p-nitrofenilbutirato. A reação foi realizada, medida e seguida a 600 rpm, no comprimento de onda de 400 nm e durante 90 segundos, respetivamente. A atividade do extrato enzimático é dada por:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\varepsilon \times V_R}{V_E \times T} \times F.D \quad (\text{Equação 2})$$

onde U/ml é a unidade enzimática definida como uma µmol de produto formada por minuto de ml de enzima, m o declive da reta (gráfico absorvâncias VS tempo (T) (segundos)),  $\varepsilon$  a absortividade molar (18,75 µmol/ml),  $V_R$  o volume reacional da cuvette (1,5 ml),  $V_E$  o volume de enzima adicionado (0,015 µl) e o fator de diluição (F.D).

#### Reação de síntese de laureato de propilo (PLU)



A reação de síntese deste éster é obtida através da adição a frascos de 5 ml com tampa, e agitadores magnéticos (Figura 3.1) de 200 mg do ácido láurico, 10 mg ou 100 mg de enzima imobilizado e 90 µl de 1-propanol mais 8 µl de água. Esta reação é realizada com agitação (100 – 200 rpm), decorrendo durante 15 minutos, 1 hora ou mais tempo de reação. A síntese deste éster decorre a 50°C, uma vez que é a temperatura de fusão do ácido láurico, apenas quando este composto se encontrar fundido é que se procede ao início da contagem do tempo. No final da reação procede-se à adição de todo o conteúdo líquido dos frascos reacionais a eppendorfs de 2 ml contendo já 1,5 ml de etanol a 96% com a finalidade de parar a reação ao desnaturar a enzima. Estes eppendorfs vão a centrifugar durante 1 minuto para depositar qualquer partícula de suporte ou precipitado de enzima. A conversão do ácido láurico foi determinada através da Equação 5.

Utilizando a Cal B foram realizadas reações de síntese de laureato de propilo com diferentes teores de água, como se pode observar na tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Proporção de água na reação de síntese de laureato de propilo pela Cal B (v/v)

Volume de ácido láurico (μl)	Volumes de propanol (μl)	Volume de água (μl)	Teor de água (% v/v)
230	90	8	2,44
230	94	4	1,22
230	97	1	0,30
230	97,5	0,5	0,15

#### Reação de síntese do caproato de hexilo



A reação de síntese do caproato de hexilo é obtida através da adição de 125 μl de ácido capróico, 100 mg de enzima imobilizada, 150 μl de 1-hexanol e 8 μl de água a frascos de 5 ml com tampa, e agitadores magnéticos (Figura 3.1). Esta reação é realizada com agitação (200 rpm) e decorrendo durante a vários tempos à temperatura de 30°C.

Ao fim deste tempo procede-se à extração e adição de todo o conteúdo líquido dos frascos para eppendorfs de 2 ml contendo já 1,5 ml de etanol a 96% com a finalidade de parar a reação ao desnaturar a enzima. De seguida procede-se à centrifugação dos eppendorfs durante 1 minuto para que deposite qualquer partícula de suporte ou precipitado de enzima. A conversão do ácido capróico foi determinada através da Equação 5.

Na tabela 3.6 encontram-se as informações relativas aos diferentes teores de água utilizados nas reações de síntese de caproato de hexilo com a Cal B.

Tabela 3.6 - Proporção de água na reação de síntese de caproato de hexilo pela Cal B (v/v)

Volumes de ácido capróico (μl)	Volumes de hexanol (μl)	Volumes de água Milli-Q (μl)	Teor de água (%)
125	150	8	2,80
125	154	4	1,40
125	156	2	0,70
125	157	1	0,35
125	157,5	0,5	0,17



Figura 3.1 - Frasco de reação com tampa e agitador magnético usados nas reações de síntese do laureato de propilo e caproato de hexilo.

### 3.3.5. Método titulométrico para a determinação da percentagem de conversão de ácido em éster

As titulações foram efetuadas em frascos de vidro com agitadores magnéticos, como se pode observar na Figura 3.2. A estes frascos adicionam-se 3 ml de etanol a 96 %, 1 ml de água Milli-Q, 500 µl do meio reacional centrifugado e recolhido após terminar a síntese do éster e 1 gota de fenolftaleína 1 %.

O ácido não consumido na síntese do éster foi quantificado pela titulação com NaOH 0,4 ou 0,1M.

$$\text{Conversão} = \left( \frac{\text{ácido adicionado} - \text{ácido não consumido}}{\text{ácido adicionado}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$



Figura 3.2. Frasco de titulação e agitador magnético utilizados no método titulométrico.

### 3.3.6. Síntese de Biodiesel

As reações de síntese do biodiesel foram efetuadas em frascos de 5 ml com tampa, e agitadores magnéticos (Figura 3.1), nas proporções de 50 mg de enzima imobilizada, 0,95 g de trioleína (óleo), 42,5 µl de água e 142,5 µl de metanol. A adição do metanol foi realizada um terço de cada vez de 4 em 4 horas.

Num segundo, terceiro e quarto grupo de experiências foram efetuadas reações nas mesmas proporções, mas com adição logo no início de 142,5 µl de metanol, butanol e etanol 96%, respetivamente.

Todas estas reações foram executadas à temperatura de 30°C e a 200 rpm.

### 3.3.7. Estudos de reutilização dos suportes com enzima imobilizada na síntese dos ésteres

Os estudos de reutilização têm a finalidade de averiguar como a enzima imobilizada nos diferentes suportes mantêm a atividade nas reações de síntese dos ésteres, pela percentagem de conversão dos respetivos ácidos.

Primeiramente, é realizada uma reação nas proporções desejadas, com o fim desta, remove-se todo o líquido e apenas o suporte permanece no interior do frasco, procedendo-se de seguida a uma nova adição dos reagentes necessários (exatamente os mesmos com que foi feita a primeira reação) para a reutilização, e repetindo este procedimento experimental.

### 3.3.8. Leitura das amostras de biodiesel através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Ao terminar as reações de síntese do biodiesel tem de se preparar as amostras para serem lidas em HPLC. A eppendorfs de 1,5 ml adiciona-se 1423,5 µl de n-hexano, 1,5 µl de ácido acético 58,5 mM, pH 2,3 e 75 µl de meio reacional recolhido após terminar a síntese. Seguidamente é efetuada a centrifugação dos eppendorfs durante 3 minutos, para que as partículas depositem. Então dá-se a passagem do conteúdo líquido dos eppendorfs (sobrenadante) para frascos de HPLC com tampa adequada à injeção automática do seu conteúdo.

Estas preparações foram injectadas e os componentes nele contido são separados através da coluna RP18 (Merck KGaA) de cromatografia líquida de alta eficiência, com método de eluição em gradiente desenvolvido por Sara Badenes [89].

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Teste e seleção de cutinase de diferentes estirpes de *E. coli* clonadas

Determinaram-se as atividades estereolíticas das enzimas cutinase liofilizadas O796G, T171C, 84 U.mol/ml.min, wild-type Pura e Cal B ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8, estes resultados podem ser observados nos gráficos 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5, respetivamente.

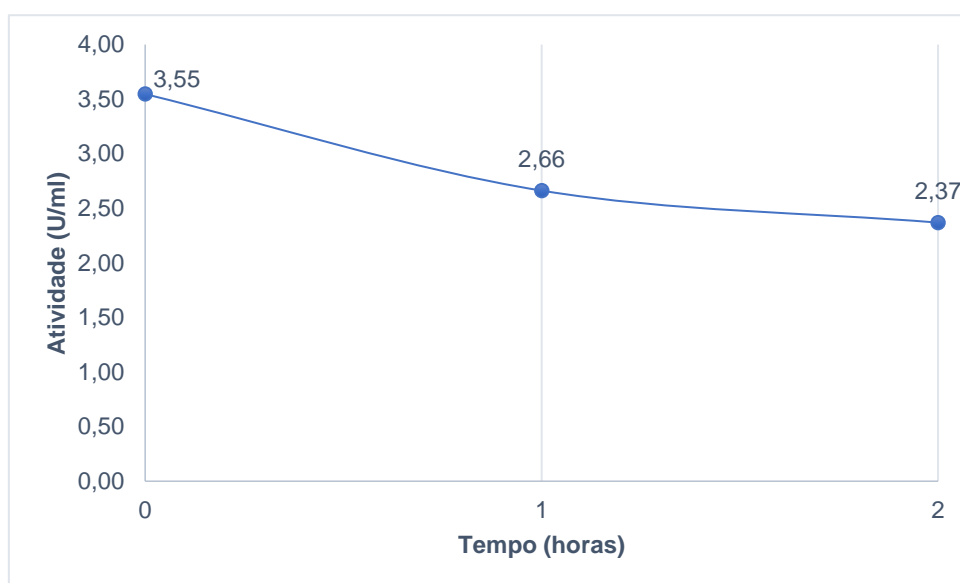


Figura 4.1 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cutinase O796G ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

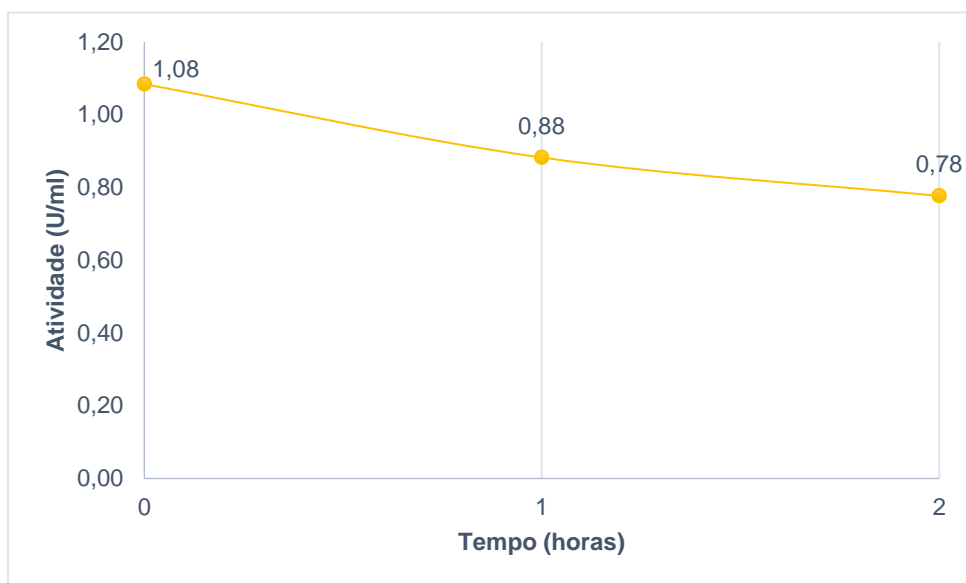


Figura 4.2 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cutinase T171C ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

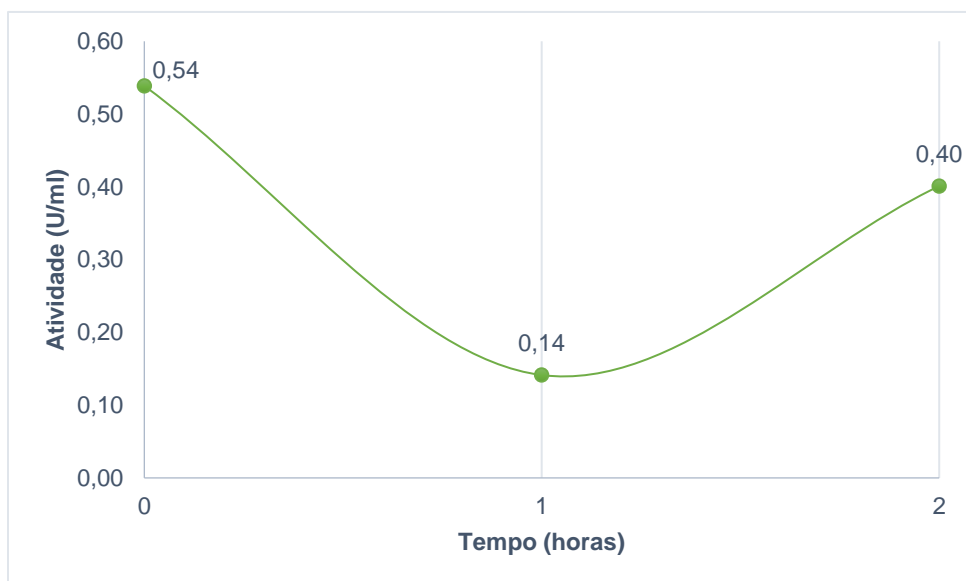


Figura 4.3 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cutinase 84 U.mol/ml.min ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).



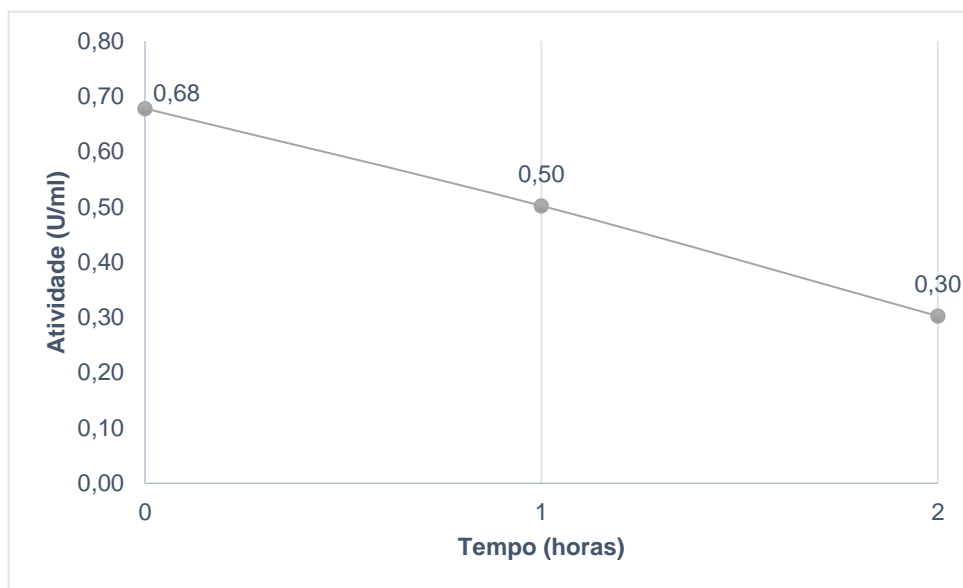


Figura 4.4 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cutinase wild-type Pura ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

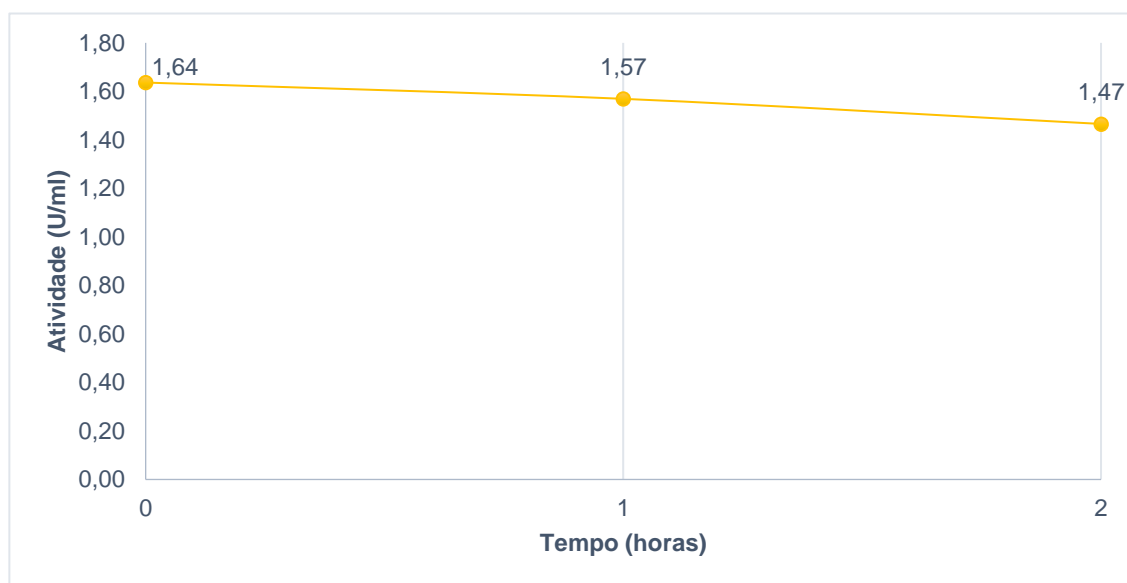


Figura 4.5 – Representação gráfica da determinação da atividade estereolítica (U/ml) da Cal B ( $\approx 16$  mg) ao fim de 0, 1 e 2 horas de ressuspensão no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (10 ml).

Atendendo a que estes resultados de atividade estereolítica são por volume de solução e que as soluções de enzima apresentam quantidades diferentes de enzima terá que se avaliar os valores de atividade específica.

## 4.2. Comparação das cutinases armazenadas com a produzida pela nova estirpe de cutinase

Determinaram-se as atividades estereolíticas das cutinases produzidas pela nova estirpe recombinante de *E. coli*, em particular, M3, M3 concentrada, J1 e J2. Estes resultados podem ser observados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) da cutinase diluída com solução Tris-HCl 20mM (pH 8).  
Determinações efetuadas com variação temporal

Amostras	Actividade (U/ml) março 2018	Actividade (U/ml) setembro 2018
Cutinase M3	833	265
Cutinase M3 (concentrada)	-	497
Cutinase J1	-	134
Cutinase J2	-	360

Na tabela 4.2, encontra-se os valores da proteína total (mg proteína / ml) das soluções enzimáticas diluídas com Tris-HCl 20 mM (pH 8) cutinases M3, M3 (concentrada), J1 e J2, e da Cal B.

Tabela 4.2 - Determinação da proteína total (mg/ml) da solução Tris-HCl 20 mM (pH 8) sobrenadante em contato com as cutinases e Cal B

Amostras	Determinação da Proteína Total	Atividade específica (U/mg)
	Concentração (mg/ml)	
Cutinase T171C	0,19	18,7
Cutinase O796G	0,00	ND
Cutinase 84 U.mol/ml.min	0,03	18
Cutinase wild- type Pura	0,002	340
Cutinase M3 em março ou setembro 2018	1,05	794 ou 252
Cutinase M3 (concentrada)	3,51	141
Cutinase J1	0,20	670
Cutinase J2	3,01	120
Cal B	1,43	1,15

Com base nestes resultados, pode-se concluir que a purificação e liofilização das cutinases conduziu à perda quase total da sua atividade. As cutinases produzidas pela nova estirpe de *E. coli* (M3, M3 concentrada, J1 e J2) foram então usadas diretamente no processo de imobilização sem purificação nos diferentes suportes disponíveis no laboratório.

#### 4.3. Adsorção da nova cutinase M3 em suportes hidrofóbicos

Determinaram-se os valores de proteína total (método de Bradford) e atividade estereolítica da solução enzimática (M3) no sobrenadante em contato com suportes hidrofóbicos, tendo esta adsorção sido efetuada utilizando uma bomba de vácuo não funcional (KNF Neuberger). Nas tabelas 4.3 e 4.4 encontram-se os resultados relativos a estas determinações.

Tabela 4.3 - Determinação da proteína total (mg/ml) do sobrenadante enzimático em contato com suportes hidrofóbicos ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), retiradas ao fim de 15 e 111 horas de adsorção. \* - Valor obtido fora da reta de calibração, A - suporte secou

Amostras	Tempo de retirada de amostra (h)	Determinação da Proteína Total
		Concentração (mg/ml)
Amberlite XAD - 2	15	1,54*
	111	1,79*
Amberlite XAD - 4	15	1,73*
	111	1,53*
Amberlite XAD - 7	15	ND
	111	0,16
Laboratories Chauny XAD - 16	15	2,79*
	111	A
DIAION HP20	15	1,71*
	111	A
Amberlite XAD - 1180	15	ND
	111	0,18
Enzima M3	15	1,56*
	111	1,59*

Tabela 4.4 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) do sobrenadante enzimático em contato com suportes hidrofóbicos ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), retiradas ao fim de 15 e 111 horas de adsorção. A - suporte secou

Amostras	Tempo de retirada de amostra (h)	Atividade (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)
Amberlite XAD - 2	15	325,3	211
	111	287,2	160
Amberlite XAD - 4	15	506,7	293
	111	245,3	160
Amberlite XAD - 7	15	1,8	$\sim 0$
	111	0,5	3
Laboratories Chauny XAD - 16	15	920,0	329
	111	A	ND
DIAION HP20	15	680,0	398
	111	A	ND
Amberlite XAD - 1180	15	4,1	$\sim 0$
	111	0,5	2,7
Enzima M3	15	352,0	225
	111	292,3	184

Neste grupo de experiências, pode-se concluir que a Amberlite XAD-7 e Amberlite XAD-1180 adsorveram praticamente toda a proteína presente na solução enzimática M3 e que a proteína imobilizada apresenta atividade. Por sua vez, os suportes Amberlite XAD-2, XAD-4, Chauny XAD-18 e DIAION HP20 não adsorveram quantidade significativa de proteína, apresentando os respectivos imobilizados pouca atividade.

#### 4.4. Adsorção da nova cutinase (M3) em suportes inorgânicos (zeólitos e alumina)

Para as imobilizações em suportes inorgânicos foram determinados os valores de proteína total (método de Bradford) (tabela 4.5) e atividade estereolítica (tabela 4.6) do sobrenadante enzimático em contato com estes. Esta adsorção foi realizada utilizando uma bomba de vácuo não funcional (KNF Neuberger).

Tabela 4.5 - Determinação da proteína total (mg/ml) do sobrenadante enzimático em contato com suportes inorgânicos (zeólitos e alumina) ( $\approx 100$  mg / 1 ml enzima), retiradas ao fim de 19 horas de adsorção. \* - Valor obtido fora da reta de calibração

Amostras	Determinação da Proteína Total
	Concentração (mg/ml)
NaX	2,36*
CaA	1,39*
NaA	2,72*
Alumina	0,01*
NaY	1,45*
Enzima M3	1,41*

Tabela 4.6 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) do sobrenadante enzimático em contato com suportes inorgânicos (zeólitos e alumina) ( $\approx 100$  mg / 1 ml enzima), retiradas ao fim de 19 horas de adsorção

Amostras	Atividade (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)
NaX	850,53	360
CaA	528,00	380
NaA	1068,80	393
Alumina	56,13	5600
NaY	497,33	343
Enzima M3	509,47	361

Neste grupo de experiência a enzima com a Alumina mostrou um efeito de adsorção apreciável da atividade e proteína. Por sua vez, o aumento dos valores de atividade e proteína no sobrenadante enzimático após de 19 horas de contato com os suportes NaX e NaA relação aos valores da solução enzimática M3 é devido a um efeito do tipo peneiro molecular. Este efeito é responsável pela apreciável adsorção da água e outros compostos mais pequenos deixando no sobrenadante a cutinase e outras proteínas de maior peso molecular que provocou o aumento da atividade e proteína.

#### 4.5. Adsorção da nova cutinase (M3) em suportes iônicos

Para os suportes iônicos Dowex 50W - X8, AG 50W – X8, AG 50W – X2, Amberlite IRC 50, IRA – 400 e IRA-48 foram determinados os valores de proteína total (método de Bradford)

(Tabela 4.7) e atividade estereolítica (tabela 4.8) da solução e enzima (M3 a pH 6,93) sobrenadante enzimático em contato com estes.

Tabela 4.7 - Determinação da proteína total (mg/ml) do sobrenadante enzimático em contacto com suportes iônicos ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), retiradas ao fim de 16 e 40 horas, a 150 rpm e a 25°C

Amostras	Tempo de retirada de amostra (h)	Determinação da Proteína Total
		Concentração (mg/ml)
Dowex 50W - X8	16	1,46
	40	1,74
AG 50W - X8	16	0,02
	40	0,00
AG 50W - X2	16	0,00
	40	ND
Amberlite IRC 50	16	ND
	40	0,55
Amberlite IRA - 400	16	1,19
	40	1,48
Amberlite IRA - 480	16	1,27
	40	1,68
Enzima M3 (pH 6,93)	16	1,29
	40	1,41

Tabela 4.8 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) do sobrenadante enzimático em contato com suportes iônicos ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), ao fim de 16 e 40 horas, a 150 rpm e a 25°C

Amostras	Tempo de retirada de amostra (h)	Atividade (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)
Dowex 50W - X8	16	343,6	235
	40	517,5	297
AG 50W - X8	16	105,9	-
	40	0,0	$\sim 0$
AG 50W - X2	16	0,9	$\sim 0$
	40	ND	ND
Amberlite IRC 50	16	1199,1	ND
	40	87,3	25
Amberlite IRA - 400	16	1009,9	849
	40	491,1	332
Amberlite IRA - 480	16	1100,8	867
	40	593,6	353
Enzima M3 pH 6,93	16	838,4	650
	40	636,0	451

Neste grupo de experiências, destaca-se a adsorção praticamente total de atividade e proteína nos suportes de permuta catiónica AG 50W-X8, AG 50W-X2 e Amberlite IRC 50.

Com base nestes resultados foram realizadas um novo grupo de experiências com os suportes de permuta catiónica Dowex 50W - X8, AG 50W – X8 e AG 50W – X2 com soluções enzimáticas M3 com valores de pH corrigidos entre 2 – 3,50 e 4,40 – 4,80. No final procedeu-se à determinação da atividade e proteína no sobrenadante enzimático após contato com os suportes. Os resultados destas determinações encontram-se apresentados nas tabelas 4.9 e 4.10, respetivamente.

Tabela 4.9 - Determinação da proteína total (mg/ml) da solução de enzima (M3 com valores de pH corrigidos) e do sobrenadante enzimático em contato com suportes iónicos (com ajuste de pH) ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), retiradas ao fim de 16 e 40 horas, a 150 rpm e a 25°C. \* - Valor obtido fora da reta de calibração

Amostras	pH	Tempo de retirada de amostra (h)	Determinação da Proteína Total
			Concentração (mg/ml)
Dowex 50W-X8	2,60	19	0,10
	4,75	68	0,35*
AG 50W-X8	3,40	19	0,04
	4,49	68	0,19
AG 50W-X2	2,03	19	0,00
	4,70	68	0,00

Tabela 4.10 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) do sobrenadante enzimático em contato com suportes iónicos (com variação de pH) ( $\approx 500$  mg / 5 ml enzima), ao fim de 16 e 40 horas, a 150 rpm e a 25°C

Amostras	pH	Tempo de retirada de amostra (h)	Actividade (U/ml)
Dowex 50W-X8	2,60	19	200,0
	4,75	68	147,7
AG 50W-X8	3,40	19	95,3
	4,49	68	40,0
AG 50W-X2	2,03	19	177,9
	4,70	68	12,5

Os baixos valores de proteína total no sobrenadante enzimático neste grupo de experiências, permite concluir que houve adsorção da cutinase, mas trouxe benefícios significativos em relação aos valores de atividade obtidos a partir de M3 sem correção do pH (tabela 4.8).

#### 4.6. Adsorção da nova cutinase (M3) em suportes covalentes

Para os suportes covalentes metacrilato de epóxi butilo, metacrilato de epóxi e metacrilato de amina foram determinados os valores de proteína total (método de Bradford) (tabela 4.11) e

atividade estereolítica (Tabela 4.12) do sobrenadante enzimático em contato com estes. A solução enzimática M3 apresentava nesta altura uma atividade de 264 U/ml, isto é, uma atividade específica de 188 a 205 U/mg proteína.

Tabela 4.11 - Determinação da proteína total (mg/ml) do sobrenadante enzimático em contato com suportes covalentes ( $\approx 50$  mg / 5 ml em cada período), em orbital e à temperatura ambiente. \* - Valor obtido fora da reta de calibração

Amostras	Tempo de adsorção do suporte com cutinase (M3)	Determinação da Proteína Total
		Concentração (mg/ml)
Metacrilato de epóxi butilo	2 h	0,07*
	Overnight	0,04*
Metacrilato de epóxi	2 h	0,85
	Overnight	0,30*
Metacrilato de amina	2 h	0,64
	Overnight	0,85

Tabela 4.12 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) sobrenadante enzimático em contacto com suportes covalentes ( $\approx 50$  mg / 5 ml em cada período), em orbital e à temperatura ambiente

Amostras	Tempo de adsorção do suporte com cutinase (M3)	Atividade (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)
Metacrilato de epóxi butilo	2 horas	0,14	2
	Overnight	0,15	4
Metacrilato de epóxi	2 horas	0,07	0,1
	Overnight	0,11	0,4
Metacrilato de amina	2 horas	0,00	0
	Overnight	0,09	0,1

Neste grupo de experiências, destaca-se uma diminuição muito acentuada dos valores da atividade no sobrenadante enzimático que teve em contato com os suportes para imobilização covalente. Pode-se assim concluir que a capacidade máxima de imobilização da cutinase por estes suportes não foi atingida e deve ser possível aumentar significativamente se for disponibilizada mais enzima no processo de imobilização.

#### 4.6.1. Aumento de escala

Procedeu-se a um aumento de escala, uma vez que a quantidade de suporte covalente metacrilato de epóxi butilo era insuficiente para a realização de mais ensaios experimentais.



Tendo isto em vista, este suporte foi imobilizado por duas vezes, uma utilizando as preparações de enzima M3 (265 U/ml e 1,05 mg/ml) e J1 (134 U/ml e 0,2 mg/ml), e outra com a enzima J2 (360 U/ml e 3,01 mg/ml). Determinando-se para cada os valores de proteína total (método de Bradford) (tabela 4.13) e atividade estereolítica (tabela 4.14) do sobrenadante enzimático em contacto com este suporte.

Tabela 4.13 - Determinação da proteína total (mg/ml) da mistura dos sobrenadantes enzimáticos após contato com o suporte covalente Metacrilato de epóxi butilo (1 g), em agitação orbital e à temperatura ambiente. Suporte contata por 3 ou 4 vezes com respectivos volumes de enzima e tempos de imobilização

Amostras	Tempo de adsorção do suporte com enzima	Volume de enzima adicionada	Determinação da Proteína Total
			Concentração (mg/ml)
Metacrilato de epóxi butilo	1 h	25 ml enzima M3	0,56
	1 h	25 ml enzima M3	
	1 h	25 ml enzima J1	
	Overnight	25 ml enzima J1	
Metacrilato de epóxi butilo	2 h	25 ml enzima J2	0,72
	2 h	25 ml enzima J2	
	Overnight	25 ml enzima J2	

Tabela 4.14 - Determinação da atividade estereolítica (U/ml) e atividade específica (U/mg) da mistura dos sobrenadantes enzimáticos após contato com o suporte covalente Metacrilato de epóxi butilo (1 g), em agitação orbital e à temperatura ambiente. Suporte contata por 3 ou 4 vezes com respectivos volumes de enzima e tempos de imobilização.

Amostras	Tempo de adsorção do suporte com enzima	Volume de enzima adicionada	Atividade (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)
Metacrilato de epóxi butilo	1 h	25 ml enzima M3	1,6	2,9
	1 h	25 ml enzima M3		
	1 h	25 ml enzima J1		
	Overnight	25 ml enzima J1		
Metacrilato de epóxi butilo	2 h	25 ml enzima J2	17,7	25
	2 h	25 ml enzima J2		
	Overnight	25 ml enzima J2		

No grupo de experiências anteriores verificou-se a capacidade dos diferentes suportes para adsorver e imobilizar a cutinase expressa e excretada pela nova estirpe de *E. coli* recombinante. O passo seguinte foi testar a eficiência destes suportes com enzima imobilizada na síntese de ésteres e selecionar alguns para a síntese do Biodiesel.

#### 4.7. Caracterização da atividade da cutinase imobilizada na síntese do laureato de propilo

Os suportes hidrofóbicos, inorgânicos e iônicos foram comparados com a cutinase wild-type pura e Cal B livres na síntese do laureato de propilo pela percentagem de ácido láurico convertido, como se pode observar nas tabelas, 4.15, 4.16 e 4.17.

Tabela 4.15 - Determinação da conversão de ácido láurico durante 15 minutos, 1 e 21 horas a 50°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida nos suportes hidrofóbicos ( $\approx 10$  mg), Cal B ( $\approx 5$  mg) e Cutinase wild-type Pura ( $\approx 5$  mg)

Biocatalisador	Tempo de reação	Conversão de ácido láurico (%)
Amberlite XAD - 2	15 minutos	0,0
	1 hora	ND
	17 horas	ND
Amberlite XAD - 4	15 minutos	0,0
	1 hora	ND
	17 horas	ND
Amberlite XAD - 7	15 minutos	5,9
	1 hora	10,0
	17 horas	0,0
Laboratoires Chauny XAD - 16	15 minutos	0,0
	1 hora	6,3
	17 horas	0,0
DIAION HP20	15 minutos	0,0
	1 hora	10,0
	17 horas	3,0
Amberlite XAD - 1180	15 minutos	0,0
	1 hora	ND
	17 horas	ND
Cal B	15 minutos	ND
	1 hora	62,5
	17 horas	83,0
Cutinase Pura	15 minutos	ND
	1 hora	25,0
	17 horas	20,0

Tabela 4.16 - Determinação da conversão de ácido láurico durante 15 minutos, 1 e 21 horas a 50°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida em suportes inorgânicos ( $\approx 10$  mg), Cal B ( $\approx 5$  mg) e Cutinase Pura ( $\approx 5$  mg)

Biocatalisador	Tempo de reação	Conversão de ácido láurico (%)
Zeólito NaX	15 minutos	20,3
	1 hora	14,6
	21 horas	22,9
Zeólito CaA	15 minutos	13,9
	1 hora	8,5
	21 horas	0,0
Zeólito NaA	15 minutos	0,0
	1 hora	9,8
	21 horas	34,3
Zeólito NaY	15 minutos	8,9
	1 hora	14,6
	21 horas	0,0
Alumina	15 minutos	10,1
	1 hora	3,7
	21 horas	0,0
Cal B	15 minutos	21,5
	1 hora	63,4
	21 horas	81,4
Cutinase wild-type Pura	15 minutos	11,4
	1 hora	4,9
	21 horas	0,0

Tabela 4.17 - Determinação da conversão de ácido láurico durante 1 hora a 50°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima (cutinase M3) adsorvida nos suportes iônicos ( $\approx 10$  mg), Lipase B ( $\approx 5$  mg) e Cutinase wild-type pura ( $\approx 5$  mg)

Biocatalisador	Conversão de ácido láurico (%)
Dowex 50W-X8	15,5
AG 50W-X8	17,9
AG 50W-X2	9,5
Amberlite IRC 50	0,0
Amberlite IRA-400	2,4
Amberlite IRA-480	9,5
Lipase B	75,0
Cutinase Pura	0,0

Neste grupo de experiências, pode-se constatar que a cutinase adsorvida em suportes hidrofóbicos, inorgânicos e iônicos bem como a cutinase wild-type pura não tem grande eficiência em sintetizar o laureato de propilo nestas condições experimentais quando se compara com a eficiência evidenciada pela Cal B livre (75 – 85% ao fim de 1 hora de reação a 50°C).

Estes resultados podem estar associados à excelente eficiência demonstrada pela cutinase em reação de hidrólise (p-NPB) em comparação com a Cal B e, por isso, apresentar baixa capacidade de sintetizar ésteres nestas condições experimentais.

A outra hipótese para explicar a baixa eficiência de síntese do laureato de propilo pela cutinase livre ou adsorvida nos diferentes suportes provavelmente está associado à baixa estabilidade desta enzima a temperaturas acima dos 45°C, como foi demonstrado por Eduardo Melo [103].

#### 4.7.1. Efeito do teor de água na síntese do laureato de propilo da Cal B

Para a enzima Cal B foi estudado o efeito de diferentes teores de água, de forma a se identificar o melhor teor, uma vez que esta apresenta uma grande percentagem de conversão de ácido láurico. Os resultados relativos a esta determinação podem ser observados na tabela 4.18.

Tabela 4.18 - Determinação da conversão de ácido láurico durante 1 hora a 50°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela Lipase B ( $\approx 5$  mg) com diferentes teores de água

Amostras	Conversão de ácido láurico (%)
Cal B 2,44% H <sub>2</sub> O	60,5
Cal B 1,22% H <sub>2</sub> O	65,8
Cal B 0,30% H <sub>2</sub> O	0,0
Cal B 0,15% H <sub>2</sub> O	5,1
Cal B 0% H <sub>2</sub> O	0,0

Tendo em conta os resultados acima mencionados, pode-se concluir que a CAL B expressou praticamente a sua eficiência máxima de síntese do éster para o teor de água presente no início do meio reacional (2,44% v/v).

#### 4.8. Caracterização da atividade da cutinase imobilizada na síntese do caproato de hexilo

Neste grupo de experiências para a caracterização da cutinase adsorvida ou imobilizada em alguns dos suportes, procedeu-se ao estudo da sua eficiência na síntese de caproato de hexilo a 30°C. Foram determinadas as percentagens de consumo do ácido capróico no meio reacional e incorporado na estrutura do éster (caproato de hexilo).

Para os suportes iónicos com variação de pH, procedeu-se a esta determinação durante 1 hora, cujos resultados podem-se observar na seguinte tabela 4.19.

Tabela 4.19 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida nos suportes iónicos ( $\approx 100$  mg), com ajuste de pH.

Biocatalisador	pH	Conversão de ácido capróico (%)
Dowex 50W-X8	2,60	16,3
	4,75	22,8
AG 50W-X8	3,40	12,0
	4,49	23,9
AG 50W-X2	2,03	12,0
	4,70	15,2

Para os suportes hidrofóbicos (Amberlite XAD – 7 e XAD – 1180), zeólito NaA e Alumina foi efetuada esta determinação durante 1 hora, uma a 30°C e outra à temperatura ambiente (25°C), cujos resultados são apresentados nas tabelas 4.20 e 4.21, respetivamente. Na tabela 4.22 encontram-se os dados relativos a esta determinação a 30°C para a Amberlite XAD – 1180, alumina e Lipase B durante 1, 12 e 24 horas.

Tabela 4.20 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida nos suportes hidrofóbicos e inorgânicos ( $\approx 100$  mg)

Biocatalisador	Conversão ácido capróico (%)
Amberlite XAD-7	17,6
Amberlite XAD-1180	45,6
Alumina	45,6
Zeólito NaA	13,2

Tabela 4.21 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, à temperatura ambiente (25°C) e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida nos suportes hidrofóbicos e inorgânicos ( $\approx 100$  mg)

Biocatalisador	Conversão de ácido capróico (%)
Amberlite XAD-7	0,0
Amberlite XAD-1180	0,0
Alumina	25,0
Zeólito NaA	0,0

Tabela 4.22 - Determinação da quantidade de ácido capróico durante 1, 12 e 24 horas, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida na Amberlite XAD-1180 e Alumina ( $\approx 100$  mg) e Cal B ( $\approx 5$  mg)

Biocatalisador	Tempos de reação(h)	Conversão de ácido capróico (%)
Amberlite XAD-1180	1	26,8
	12	20,0
	24	14,1
Alumina	1	43,7
	12	63,1
	24	39,1
Cal B	1	90,1
	12	89,2
	24	90,6

De acordo com estes resultados, chega-se à conclusão que é possível a síntese do caproato de hexilo à temperatura de 30°C, em particular, a enzima imobilizada no suporte inorgânico alumina (63%), mas é menos eficiente do que a Cal B (89%) ao fim de 12 horas de reação.

A cutinase adsorvida ou imobilizada nos suportes deve desnaturar à temperatura de 50°C conforme observado e sugerido por Eduardo Melo [103] e por esse motivo perde a sua capacidade de proceder à síntese do laureato de propilo.

Em face destes resultados, procedeu-se à preparação de uma quantidade de biocatalizador de cutinase adsorvida em alumina. Assim, a Alumina (250 mg) foi colocada a adsorver com diferentes volumes de enzima cutinase (M3), com recurso a uma bomba de vácuo funcional (KNF LAB LABOPORT). No final com os suportes secos, foi determinada a percentagem de

consumo do ácido capróico durante 1 e 21 horas para este biocatalisador, por titulação com NaOH 0,1 M, como se pode observar nas tabelas 4.23 e 4.24.

Tabela 4.23 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida na Alumina ( $\approx 100$  mg) com diferentes volumes de enzima cutinase (M3) utilizados

Biocatalisador	Volumes de solução de cutinase M3 (ml)	Conversão de ácido capróico (%)
Alumina	0,5	21,5
Alumina	1	30,4
Alumina	1,5	28,9
Alumina	2	36,9
Alumina	2,5	39,2

Tabela 4.24 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 21 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima imobilizada na Alumina ( $\approx 100$  mg) com diferentes volumes de enzima cutinase (M3) utilizados

Biocatalisador	Volumes de solução de cutinase M3 (ml)	Conversão ácido capróico (%)
Alumina	0,5	9,4
Alumina	1	23,4
Alumina	1,5	46,9
Alumina	2	53,1
Alumina	2,5	62,2

Neste grupo de experiências, pode-se concluir que os resultados são reprodutíveis face aos resultados anteriores e confirma-se que a cutinase tem capacidade de sintetizar o caproato de hexilo a 30°C com uma conversão de 62% ao fim de 21 horas de reação. Estes valores de conversão obtidos poderão sugerir que foi atingido o equilíbrio na síntese deste éster, nestas condições experimentais.

#### 4.8.1. Efeito do teor em água inicial na síntese e da atividade da água na secagem da alumina

De acordo com os resultados da experiência anterior e tendo em conta a importância do teor em água inicial no meio reacional e no suporte foi estudado em seguida o processo de adsorção da cutinase e um passo de secagem da alumina em condições de atividade de água controlada ( $a_w$  de 0,97).

Para a Alumina (250 mg / 3 ml) ( $a_w = 0,97$ ) durante 1 e 12 horas, foi determinada a percentagem de consumo do ácido capróico na presença e ausência de água em cada meio reacional, cujos resultados são exibidos nas tabelas 4.25 e 4.26.

Tabela 4.25 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida com atividade de água ( $a_w$ ) igual a 0,97 na Alumina ( $\approx 100$  mg)

	Biocatalisador	Conversão de ácido capróico (%)
Reação efetuada com 8 $\mu$ l de água	Alumina ( $a_w = 0,97$ )	29,5
Reação efetuada sem água	Alumina ( $a_w = 0,97$ )	26,0

Tabela 4.26 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 12 hora, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima imobilizada com atividade de água ( $a_w$ ) igual a 0,97 na Alumina ( $\approx 100$  mg)

	Biocatalisador	Conversão de ácido capróico (%)
Reação efetuado com 8 $\mu$ l de água	Alumina ( $a_w = 0,97$ )	60,0
Reação efetuada sem água	Alumina ( $a_w = 0,97$ )	83,3

De acordo com este grupo de experiências, prova-se claramente que a cutinase adsorvida em alumina apresenta eficiência de reação de esterificação e que a presença inicial de água no meio reacional conduz a um equilíbrio termodinâmico correspondente a 60% de conversão ao fim de 12 horas de reação. Este valor é inferior a 83,3% atingido na total ausência de água inicial no mesmo tempo de reação (tabela 4.26).

Com base nestes resultados, procedeu-se à confirmação desta conclusão e dos resultados anteriores com um maior detalhe da evolução da conversão do ácido capróico no respetivo éster com total ausência de água inicial no meio reacional, para dois grupos de ensaios com o mesmo suporte alumina com cutinase adsorvida mas seco em condições de atividade de água controlada ( $a_w$  de 0,97).



Tabela 4.27 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 3, 5, 24 e 26 horas, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida com atividade de água ( $a_w$ ) igual a 0,97 na Alumina ( $\approx 100$  mg)

Biocatalisador	Horas de Reação (h)	Conversão de ácido capróico (%)
Alumina	3	44,4
Alumina	5	62,5
Alumina	24	91,1
Alumina	26	90,3

Tabela 4.28 - Determinação da conversão de ácido capróico durante 1, 3, 5, 20, 22, 24 e 26 horas, a 30°C e 200 rpm nas reações catalisadas pela enzima adsorvida com atividade de água ( $a_w$ ) igual a 0,97 na Alumina ( $\approx 100$  mg)

Biocatalisador	Horas de Reação (h)	Conversão de ácido capróico (%)
Alumina	1	33,6
Alumina	3	44,9
Alumina	5	49,6
Alumina	20	64,4
Alumina	22	74,0
Alumina	24	78,8
Alumina	26	84,0

Com este grupo de ensaios, verifica-se um consumo crescente de ácido caproico e aumento da sua conversão em éster atingindo cerca de 90% ao fim de 26 horas de reação nestas condições experimentais. Esta eficiência na síntese deste éster é comparável à obtida pela Cal B livre nas mesmas condições reacionais anteriores (tabela 4.22).

#### 4.8.2. Efeito do teor de água no meio reacional na síntese do caproato de hexilo pela Cal B

Com a Cal B livre no meio reacional obteve-se  $\approx 90\%$  de conversão do ácido capróico foi agora verificar-se se este valor é do equilíbrio termodinâmico nestas condições reacionais através do estudo do teor em água presente logo no início do meio reacional. Assim, para a enzima Cal B foram efetuadas reações de síntese deste éster com diferentes teores de água. Os resultados relativos a esta determinação podem ser observados na tabela 4.29 .

Tabela 4.29 - Determinação da quantidade de ácido capróico durante 1 hora a 30°C, e 200 rpm nas reações catalisadas pela Cal B ( $\approx 5$  mg) com diferentes teores de água

Amostras	Conversão de ácido capróico (%)
Cal B 2,80% H <sub>2</sub> O	81,6
Cal B 1,40% H <sub>2</sub> O	76,9
Cal B 0,70% H <sub>2</sub> O	79,5
Cal B 0,35% H <sub>2</sub> O	73,2
Cal B 0,17% H <sub>2</sub> O	22,2

De acordo com estes resultados experimentais observa-se uma maior síntese de caproato de hexilo quando há 2,14% (v/v) de água logo no início do meio reacional e para teores de água mais elevados há uma pequena diminuição da conversão principalmente para teores inferiores a 0,27% (v/v).

#### 4.9. Estudos de estabilidade (reutilizações) dos suportes com cutinase imobilizada

Para estudar a estabilidade dos suportes com cutinase adsorvida ou imobilizada covalentemente procedeu-se à sua reutilização e determinaram-se as percentagens de conversão do ácido capróico para os imobilizados em Alumina (agitação magnética) e suportes covalentes metacrilato de epóxi butilo, metacrilato de epóxi e metacrilato de amina (agitação orbital), metacrilato de epóxi butilo e metacrilato de amina (agitação magnética), cujos resultados são apresentados nos gráficos 4.6, 4.7 e 4.8, respetivamente.

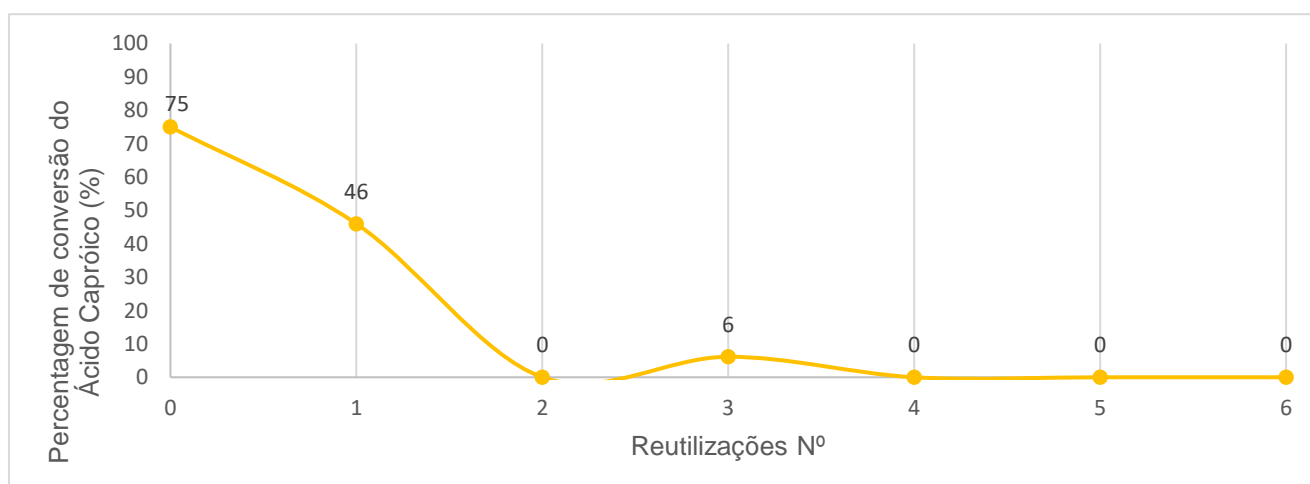


Figura 4.6 – Representação gráfica das percentagens de conversão do ácido capróico VS número de reutilizações (6) da Alumina (5 mg), nas condições operacionais de 30°C, agitação magnética de 200 rpm e durante 1 hora cada reação (7,5 µl de hexanol e 6,25 µl de ácido caproico sem água inicial). Alumina (250 mg) e 300 µl da enzima Cutinase M3 concentrada.

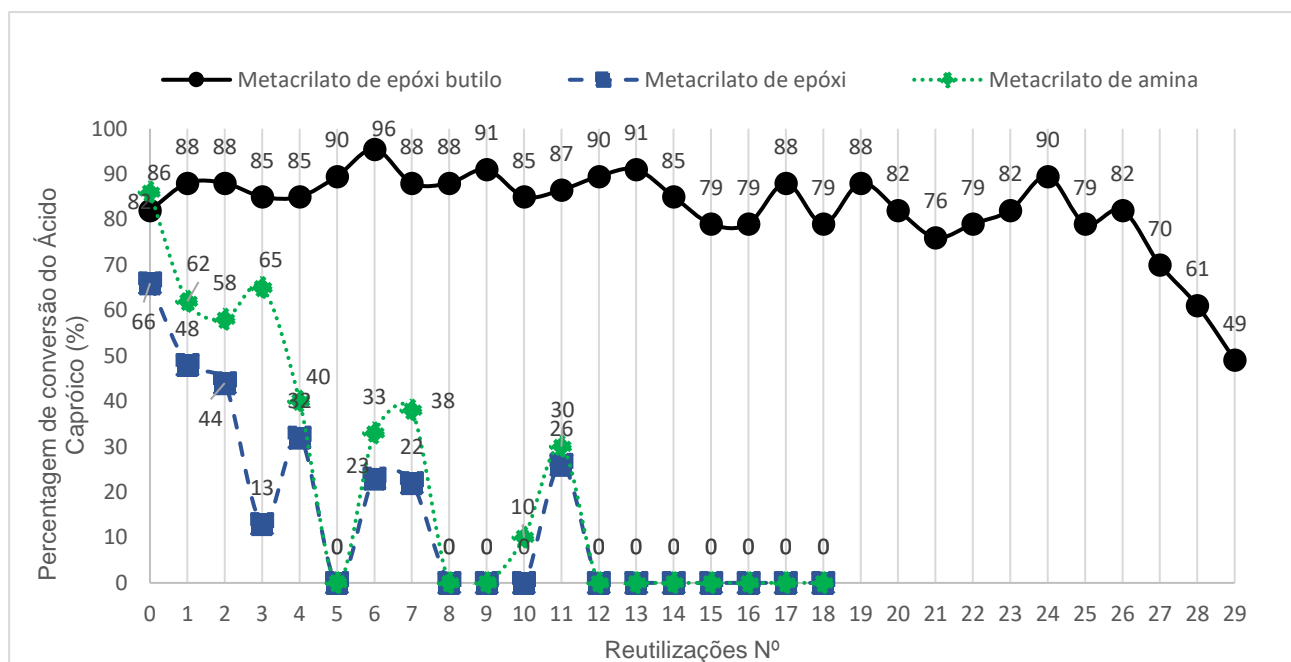


Figura 4.7 – Representação gráfica das percentagens de conversão do ácido capróico VS número de reutilizações (29, 18 e 18, respetivamente) de suportes com cutinase imobilizada covalentemente metacrilato de epóxi butilo, metacrilato de epóxi e metacrilato de amina (10 mg cada), nas condições operacionais de 30°C durante 1 hora cada reação e com agitação magnética de 200 rpm (15 µl de hexanol e 12,5 µl de ácido caproico sem água inicial).

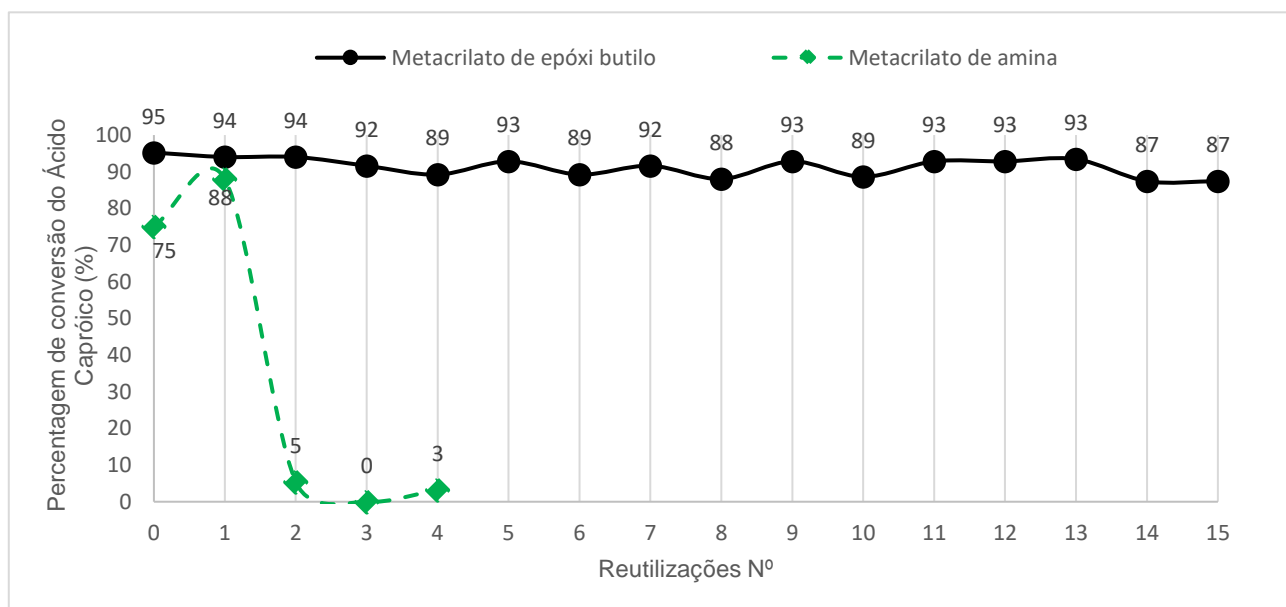


Figura 4.8 – Representação gráfica das percentagens de conversão do ácido capróico dos suportes covalentes metacrilato de epóxi butilo e metacrilato de amina (10 mg cada) VS número de reutilizações (15 e 4 respetivamente). Reações efetuadas nas condições operacionais de 30°C, 1 hora cada reação e agitação magnética de 200 rpm (15 µl de hexanol e 12,5 µl de ácido caproico sem água inicial).

O fato destas reações terem sido desenvolvidos sem solvente poderá ter feito com que a dessorção da enzima seja maior, perdendo assim atividade e por isso não se conseguiram realizar mais reutilizações com a enzima imobilizada por adsorção na alumina.

Quando a cutinase está imobilizada covalentemente apresenta maior capacidade para ser reutilizada em reações de esterificação nestas condições experimentais. O suporte metacrilato de epóxi butilo apresenta melhores resultados, conseguindo ter sido reutilizado 29 vezes sem diminuição do grau de conversão, enquanto que os suportes metacrilato de epóxi e amina perderam 50% da sua capacidade de esterificação ao fim de 18 reutilizações.

#### 4.10. Síntese de Biodiesel

As reações de síntese de biodiesel com cutinase adsorvida em suportes alumina, cutinase imobilizada covalentemente em suportes metacrilados de epóxi butilo e as enzimas livres de Cal B e cutinase J2 foram realizadas, conforme descrito no ponto 3.3.6.

Os resultados das reações obtidas pelas análises de HPLC são apresentados em anexo (Anexo I, II e III). De acordo com estudos anteriores [62] os tempos de residência são: entre 3 e 5 minutos para os ésteres, 5 e 8 minutos para os monoglicerídeos, entre 10 e 14 minutos para os diglicerídeos, e entre 18 e 22 minutos para os triglicerídeos.

Na figura 4.9 apresenta-se um exemplo de cromatograma obtido por HPLC de uma amostra reacional.

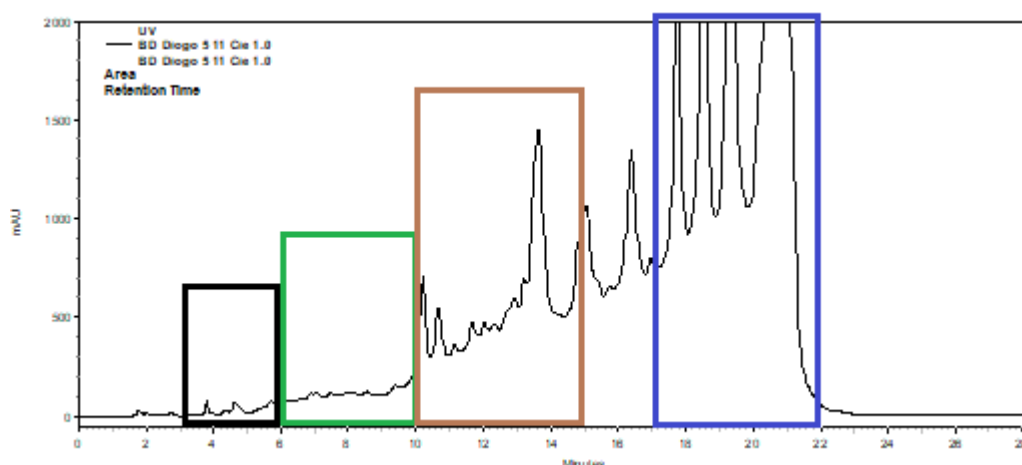


Figura 4.9 – Cromatograma com as zonas de tempo respetivas de substratos, intermediários e produtos. Retângulo preto (3 a 6 minutos) – zona temporal de deteção de ésteres, retângulo verde (6 a 10 minutos) – zona temporal de deteção de monoglicerídeos, retângulo castanho (10 a 15 minutos) – zona temporal de deteção de diglicerídeos, retângulo azul (17 a 22 minutos) – zona temporal de deteção de triglicerídeos. Gráfico de autoria própria.

Como não foi possível fazer-se uma análise quantitativa dos substratos e produtos da reação no final desta, apenas foi possível fazer uma análise qualitativa dos resultados. Assim será utilizada a seguinte simbologia: + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres.

#### 4.4.1. Efeito da adição de metanol por três vezes correspondente a 1/3 do valor estequiométrico

O resumo deste grupo de experiências é apresentado na tabela seguinte (4.30). Os Cromatogramas encontram-se em Anexo I.

Tabela 4.30 – Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol (1/3 adicionado a cada 4 horas) e 42,5 µl de água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Biocatalisador	Cromatograma ID	Resultado da Síntese Biodiesel
Branco inicial (sem enzima)	A1	-
Branco final (sem enzima)	A2	-
Cutinase J2 imobilizada em Metacrilato de epóxi butilo	A3	-
Cutinase J2 imobilizada em Alumina	A4	-
Cal B (enzima livre)	A5	++
Cutinase J2 (enzima livre)	A6	+

Apenas Cal B e a cutinase J2 livre apresentam produção de ésteres resultantes da transesterificação da trioleína com metanol. Contudo, a cutinase J2 (cromatograma A6) apresenta menos ésteres e monoglicerídeos do que a Cal B (cromatograma A5).

#### 4.4.2. Efeito da adição de metanol por três vezes mas sem adição de água no início da reação

Os resultados obtidos para este grupo de experiências são apresentados no Anexo I e encontra-se em resumo na tabela 4.31.

Tabela 4.31 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol (1/3 adicionado a cada 4 horas) sem água inicial. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Experiência e biocatalisador	Cromatograma ID	Síntese Biodiesel
Branco inicial	A7	-
Branco final	A8	-
Cutinase J2 imobilizada em Metacrilato de epóxi butilo	A9	+

A enzima imobilizada no suporte metacrilato de epóxi butilo (cromatograma A9) conseguiu nestas condições sintetizar mais alguns ésteres e monoglicerídeos em relação ao ensaio anterior com 42,5 µl de água no início da reação (cromatograma A3). Portanto, a água no início do meio reacional parece ser um fator importante na síntese do biodiesel nestas condições experimentais.

#### 4.4.3. Efeito da adição de metanol todo de uma vez no início da reação

Os resultados obtidos pela análise em HPLC são apresentados em anexo e em resumo apresentados na tabela 4.32.

Tabela 4.32 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e 42,5 µl de água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Experiência e biocatalisador	Cromatograma ID	Síntese Biodiesel
Branco inicial	A10	-
Branco final	A11	-
Cutinase J2 imobilizada em Metacrilato de epóxi butilo	A12	-
Cutinase J2 imobilizada em Alumina	A13	-
Cal B	A14	+/-

Nestas condições a cutinase imobilizada ou adsorvida não sintetiza biodiesel e mesmo a Cal B apresenta uma síntese pouco significativa de ésteres (cromatograma A14) o que leva a concluir que ocorreu inibição de atividade desta enzima na presença de elevadas concentrações iniciais de metanol no meio reacional.

#### 4.4.4. Efeito da adição de metanol todo de uma vez mas sem adição de água no início da reação

Os resultados obtidos pela análise em HPLC são apresentados em Anexo I e em resumo apresentados na tabela 4.33.

Tabela 4.33 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e sem água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Experiência e biocatalisador	Cromatograma ID	Síntese Biodiesel
Branco inicial	A15	-
Branco final	A16	-
Cutinase J2 imobilizada em Metacrilato de epóxi butilo	A17	-

A enzima imobilizada no suporte metacrilato de epóxi butilo não conseguiu nestas condições catalisar a síntese de ésteres (cromatograma A17), devido provavelmente à inibição de atividade da enzima imobilizada na presença de elevadas concentrações iniciais de metanol no meio reacional quando se compara com a experiência anterior (cromatograma A9).

#### 4.4.5. Efeito da adição de butanol todo de uma vez no início da reação

Os resultados obtidos pela análise em HPLC são apresentados em Anexo II e em resumo apresentados na tabela 4.34.

Tabela 4.34 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol e 42,5 µl de água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Experiência e biocatalisador	Cromatograma ID	Síntese Biodiesel
Branco inicial	A18	-
Branco final	A19	-
Cutinase J2 imobilizada em Metacrilato de epóxi butilo	A20	-
Cutinase J2 imobilizada em Alumina	A21	-
Cal B	A22	-

Nestas condições e comparando com ensaios anteriores a Cal B não apresenta síntese de ésteres (cromatograma A22) o que leva a concluir que esta enzima não tem capacidade de transesterificação da trioleína com butanol ou ocorreu inibição de atividade da enzima na presença de elevadas concentrações iniciais de butanol no meio reacional.

#### 4.4.6. Efeito da adição de butanol todo de uma vez mas sem adição de água no início da reação

Os resultados obtidos pela análise em HPLC são apresentados em Anexo II e em resumo apresentados na tabela 4.35.

Tabela 4.35 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e sem água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Experiência e biocatalisador	Cromatograma ID	Síntese Biodiesel
Branco inicial	A23	-
Branco final	A24	-
Cutinase J2 imobilizada em Metacrilato de epóxi butilo	A25	+/-

A enzima imobilizada no suporte metacrilato de epóxi butilo (cromatograma A25) conseguiu nestas condições sem água no início da reação sintetizar alguns ésteres e monoglicerídeos em comparação ao ensaio anterior com 42,5 µl de água no início da reação (cromatograma A20).

#### 4.4.7. Efeito da adição de etanol todo de uma vez no início da reação

Os resultados obtidos pela análise em HPLC são apresentados em Anexo III e em resumo apresentados na tabela 4.36.

Tabela 4.36 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol e 42,5 µl de água. Legenda + : presença de ésteres, ++ : presença de muitos ésteres, +/- : apresenta alguns ésteres e monoglicerídeos, - : não apresenta vestígios de monoglicerídeos ou ésteres. Cromatogramas em anexo

Experiência e biocatalisador	Cromatograma ID	Síntese Biodiesel
Branco inicial	A26	-
Branco final	A27	-
Cutinase J2 imobilizada em Metacrilato de epóxi butilo	A28	+
Cutinase J2 imobilizada em Alumina	A29	+/-
Cal B	A30	-

Nestas condições e talvez de forma surpreendente a Cal B não apresenta síntese de ésteres a partir do etanol (cromatograma A30) em comparação com a cutinase imobilizada covalentemente em metacrilato de epóxi butilo (cromatograma A28). Por sua vez, a cutinase adsorvida em alumina (cromatograma A29) é menos eficiente na síntese do bioetanol do que a cutinase imobilizada covalentemente no metacrilato de epóxi butilo nestas condições experimentais.



#### 4.4.8. Efeito da adição de etanol todo de uma vez mas sem adição de água no início da reação

Os resultados obtidos pela análise em HPLC são apresentados em Anexo III e em resumo apresentados na tabela 4.37.

Tabela 4.37 - Resultados da síntese de biodiesel com 0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol e sem água. Cromatogramas em anexo

Experiência e biocatalisador	Cromatograma ID	Síntese Biodiesel
Branco inicial	A31	-
Branco final	A32	-
Cutinase J2 imobilizada em Metacrilato de epóxi butilo	A33	-

A enzima imobilizada no suporte metacrilato de epóxi butilo (cromatograma A33) conseguiu nestas condições sintetizar menos ésteres e monoglicerídeos em relação ao ensaio anterior com 42,5 µl de água no início da reação (cromatograma A28).

A influência do teor em água em reações de transesterificação de enzimas já tinha sido vastamente estudado, nomeadamente em reações de transesterificação com a cutinase imobilizada em suportes inorgânicos [63] em que se concluiu que a atividade de água ótima era de 0,97. Em Sisira [62] e Badenes [89] evidência-se que os melhores resultados das reações de síntese do biodiesel foram obtidos utilizando um sistema micelar com  $W_o$  de 2,7.

Portanto, o teor em água no início da reação é importante ser otimizado em futuras experiências.

O tipo de álcool utilizado em reações de transesterificação de enzimas quer livre, imobilizadas em suportes sólidos ou em sistemas micelares tem sido bastante estudado. Em estudos anteriores [67, 113] foram observados os melhores resultados com a adição contínua de metanol. Em Badenes [89] e [61] a adição de todo o metanol no início da reação levou à perda de atividade enzimática da cutinase wild-type e que a lipase Lipozyme-TL IM imobilizada em hidrotalcite foi capaz de catalisar reações de transesterificação, respetivamente. A adição de todo o butanol no início da reação evidenciou os resultados em Badenes [89] de que houve uma melhoria da performance da cutinase wild-type e em Sisira [62] de produção de biodiesel da cutinase imobilizada no zeólito NaY-LZY-5. Em Mendes [30] e Badenes [89] a adição de todo o etanol no início da reação conduziu aos resultados de melhoria performance da cutinase wild-type e elevadas percentagens de transesterificação de lipases imobilizadas covalentemente em esferas de agarose, respetivamente.

## 5. Conclusão

O trabalho desenvolvido nesta dissertação contribui para a seleção de suportes de entre um grupo de suportes estudados (hidrofóbicos, inorgânicos, iônicos e covalentes) para a imobilização de cutinase recombinada de *Escherichia coli* e utilização dos biocatalisadores em reações de esterificação (síntese do laureato de propilo e caproato de hexilo) e transesterificação (síntese do biodiesel a partir da trileína).

Na primeira parte do trabalho conclui-se que as cutinases que foram purificadas, liofilizadas e posteriormente armazenadas a -20°C perderam quase toda a sua atividade, o que manifesta a ineficiente conservação desta cutinase liofilizada e influência que estes processos tiveram na atividade destas cutinases a longo prazo.

Em relação às determinações da proteína total, atividade estereolítica e específica do sobrenadante enzimático em contato com diferentes suportes, permitiram tirar as seguintes conclusões:

- Os suportes hidrofóbicos Amberlite XAD-7 e Amberlite XAD-1180 adsorveram praticamente toda a proteína presente na solução enzimática M3. Enquanto que os suportes Amberlite XAD-2, XAD-4, Chauny XAD-18 e DIAION HP20 não adsorveram quantidade significativa de proteína.
- Nos suportes inorgânicos, apenas a Alumina mostrou um efeito de adsorção apreciável de proteína. Nos suportes NaX e NaA verifica-se um aumento dos valores de atividade e proteína na solução de enzima, que se deve a um efeito do tipo peneiro molecular, havendo adsorção de água mas não de proteína em valores consideráveis.
- Os suportes (sem ajuste de pH) de permuta catiônica AG 50W-X8, AG 50W-X2 e Amberlite IRC 50 destacaram-se pela adsorção praticamente total da proteína. No entanto, após ajustes de pH entre os 2 – 3,50 e 4,40 – 4,80, os suportes de permuta catiônica Dowex 50W-X8, AG 50W-X8 e AG 50W-X2 revelaram melhorias significativas de atividade enzimática em relação aos valores sem correção de pH.
- As atividades enzimáticas por ligação covalente nos suportes metacrilato de epóxi butilo, epóxi e amina são muito elevadas, concluindo-se que a capacidade máxima de imobilização da cutinase por estes suportes não foi atingida. O estudo do aumento da quantidade imobilizada foi feita com o suporte metacrilato de epóxi butilo que mostrou melhor eficiência catalítica.

No caso da caracterização da atividade da cutinase imobilizada na síntese do laureato de propilo a 50°C, chegamos à conclusão que quando se usam os suportes hidrofóbicos, inorgânicos e iônicos bem como a cutinase wild-type pura não apresentam grande eficiência na síntese deste éster em comparação com a Cal B livre.

No caso da caracterização da atividade da cutinase na síntese do caproato de hexilo chegamos à conclusão, que é possível a promover a síntese deste éster utilizando suportes hidrofóbicos,

inorgânicos e iônicos com cutinase adsorvida, nomeadamente na alumina com 63% de conversão, revelando-se menos eficiente do que a Cal B com 89%.

Na imobilização em alumina testou-se a utilização de diferentes volumes de enzima cutinase (M3), concluindo-se que a alumina adsorvida apresenta 62,2% de conversão ao fim de 21 horas.

Para este suporte (alumina) foram efetuados ensaios de biocatalisador pré-equilibrado com atividade de água constante de 0,97 utilizando o sulfato de potássio e com, e sem água, resultando assim em percentagens de conversão similares de 29,5% ao fim de 1 hora, no entanto, ao fim de 12 horas a o biocatalisador com alumina sem água apresenta uma conversão de 83,3% comparativamente ao com água.

Como a Cal B nas determinações de conversão de ácido láurico e capríco foram efetuadas reações com diferentes teores de água, chegando-se à conclusão que a ausência ou pouca quantidade de água tem bastante influência na percentagem de conversão, enquanto que nos intervalos de 2,44 - 1,22 e 2,8 - 1,4% de água, tem conversão de 65% e 81% para a reação de síntese do laureato de propilo e caproato de hexilo, respetivamente.

Nos estudos de reutilização concluiu-se que a cutinase imobilizada covalentemente em reações de esterificação apresenta melhores resultados do que a cutinase imobilizada por adsorção. O suporte que mais se destaca é o metacrilato de epóxi butilo que pode ser reutilizado 29 vezes sem diminuição do grau de conversão e os suportes metacrilato de epóxi e amina com perda de 50% da sua capacidade de esterificação ao fim de 18 reutilizações.

Em relação à síntese do biodiesel, os resultados obtidos permitiram tirar as seguintes conclusões:

- Com a adição de metanol por 3 vezes ao longo da reação com a cutinase do lote J2 conseguiu sintetizar menos ésteres e monoglicerídeos do que a Cal B. Sem a adição de água no início da reação, o suporte metacrilato de epóxi butilo conseguiu sintetizar alguns ésteres e monoglicerídeos comparativamente com o ensaio com água.
- Com a adição de metanol todo de uma vez no início da reação, a cutinase imobilizada ou adsorvida não sintetiza biodiesel e mesmo a Cal B apresenta uma síntese pouco significativa de ésteres, o que significa que ocorreu uma inibição destas enzimas na presença de elevadas concentrações iniciais de metanol no meio reacional. Sem a adição de água no início da reação, o suporte metacrilato de epóxi butilo não apresenta, nestas condições, síntese de ésteres pela razão acima mencionada.
- Com a adição de butanol todo de uma vez no início da reação, as enzimas não apresentam síntese de ésteres, o que significa que esta enzima não tem capacidade de transesterificação da trioleína com butanol ou ocorreu inibição de atividade da enzima na presença de elevadas concentrações iniciais de butanol no meio reacional. Sem adição de água no início da reação, a enzima com o suporte metacrilato de epóxi butilo conseguiu sintetizar mais ésteres e monoglicerídeos comparativamente com o ensaio anterior.

- Com a adição de etanol todo de uma vez no início da reação, a Cal B inesperadamente não apresenta síntese de ésteres em comparação com a cutinase imobilizada covalentemente.

Face a estes resultados a cutinase apresenta-se como promissora para a síntese do biodiesel, nomeadamente quando imobilizada covalentemente no suporte metacrilato de epóxi butilo utilizando o etanol, carecendo de otimização a quantidade de água e a forma como se adiciona o álcool na reação.

## 6. Bibliografia

- [1] – Dias, F. R. F.; Ferreira, V. F.; Cunha, A. C. Uma Visão Geral dos Diferentes Tipos de Catálise em Síntese Orgânica. 2012. Ver. Virtual Quim, Vol. 4, No. 6, 840-871.
- [2] – Otori, Álvaro; Portas, Viviane; Oliveira, Camila. Redução enzimática do 4-(dimetilamino)benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): Um experimento simples na compreensão da biocatálise. 2012. Quim. Nova, Vol. 35, No. 2, 435-437.
- [3] – Lima, António; Angnes, Lúcio. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. 1999. Quim. Nova, Vol. 22, No. 2.
- [4] – Zaks. A; Klisnov, A. M. 1985. Science, 228.1280-1284.
- [5] – Cooper, G.M. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6.
- [6] – Gray, C. J; Narang, J. S.; Barker, S. A. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* and its use in the synthesis of menthol esters by transesterification. 1990. Enzyme Microb. Technol, 12. 800-807.
- [7] – Garcia, Sílvia Maria Pires. Biocatálise em Meios Não Convencionais: Solventes Orgânicos, Fluidos Supercríticos e Líquidos Iônicos. 2005. Dissertação de Doutorado. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- [8] – Halling, P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. 1994. Biotechnol, Bioeng, 55, 367-374.
- [9] – Selmi, B; Gontier, E; Ergen, F; Barbotin, J. N. T. D. Lipase-catalyzed synthesis of tricaprolin in a medium solely composed of substrates, Water production and elimination. 1997. Enzyme Microb, Technol, 221-230.
- [10] – Baron, Alessandra Machado. Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais. 2003. UFPR, Curitiba, Brasil.
- [11] – Gonçalves, Ana Paula Veloso. Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade. 1999. Dissertação de Doutorado. Instituto Superior Técnico.
- [12] – Khmelnitsky, Y. L.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L.; Martinek, K. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. 1988. Enzyme Microb, Technol, 10, 710-724.

- [13] – Crooks, G. E.; Rees, G. D.; Robinson, B. H.; Svensson, M.; Stephenson, G. R. Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions: I, Effect of pH and water content on reaction kinetics. 1995. *Biotechnol, Bioeng*, 48, 78-88.
- [14] – Cunnah, P. J.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. Esterification and transesterification catalysed by cutinase in reversed micelles of CTAB for the synthesis of short chain esters. 1996, *Biocatal, Biotrans*, 14, 125-146.
- [15] – Vieira, Mariana Antunes. Imobilização de Enzimas em Suportes Sólidos e Aplicações Sintéticas. 1999. Relatório de Graduação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- [16] – Almeida, Suhelen Tannús de. Imobilização de enzimas (lipase fúngicas) em suportes nanozeolíticos trocados com cátions de terras-raras e sua aplicação como catalisadores heterogêneos na produção de biocombustível. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- [17] – Liu, Dong-Mei; Chen, Juan; Shi, Yan-Ping. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. 2018. Elsevier.
- [18] – Chapman, Jordan; Ismail, Ahmed E.; Dinu, Cerasela Zoica. Industrial Application of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. 2018. MDPI, Journal Catalysts.
- [19] – Grigoros, A. G. Catalase immobilization - A review. 2017. Elsevier.
- [20] – Hartmeier, W. Immobilized Biocatalysts. 1988. Springer-Verlag, Berlin.
- [21] – Enzyme Immobilization Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment. 2016. Springer.
- [22] – De Dardel, F.; Arden, T. V. Ion Exchangers. 2008. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. 19, 476-478.
- [23] – Homaei, Ahmad. Enzyme Immobilization and its Application in Food Industry. 2015. ResearchGate, 14.
- [24] – Júnior, José Carlos Quilles. Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e a aplicação em biocatálise. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- [25] – Knežević-Jugović, Zorica D.; Šaponjić, Svetlana V.; Bezbradica, Dejan I.; Mijin Dušan Ž. Immobilization of lipase on sephabeads and its application in pentyl octanoate synthesis in a low aqueous system. 2008. *Acta Periodica Technologica*, Vol. 2008, Iss. 39, Pp 139-152.
- [26] – Bukhari, Attaullah; Idris, Ani; Atta, Madiha; Loong, Teo Chee. Covalente immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. 2014. *Chinese Journal of Catalysis*, Vol. 35, Issue: 9, p1555-1564, 10p.

- [27] – Kumar, Davender; Nagar, Sushil; Bhushan, Indu; Kumar, Lalit; Parshad, Rajinder; Gupta, V. K. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. 2013. Elsevier, 87:51-61.
- [28] – Xie, Wenlei; Zang, Xuezheng. Covalent immobilization of lipase onto imonopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil. 2017. Elsevier, 227:397-403.
- [29] – Bolina, Iara C. A.; Salviano, Adriana B.; Tardioli, P. W.; Cren, E. C.; Mendes, A. A. Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO<sub>2</sub> with glycine to immobilize microbial lipase - Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. 2018. Elsevier, Part B: 2354-2365.
- [30] – Mendes, A. A.; de Castro, H. F.; Giordano, R. L. C. Covalent attachment of lipases on glyoxyl-agarose beads: Application in fruit flavor and biodiesel synthesis. 2014. Elsevier, 70:78-85.
- [31] – Yu, Wei hua; Fang, Mei; Tong, Dong shen; Shao, Ping; Xu, Tian ning; Zhou, Chun hui. Regular article: Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hexagonal mesoporous silicas and selective esterification in nonaqueous medium. 2013. Elsevier, 70:97-105.
- [32] – Mehrasbi, Mohammad Reza; Mohammadi, Javad; Mazzyar, Payda; Mohammadi, Mehdi. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. 2017. Elsevier, 101: 593-602.
- [33] – Mendes, A. A.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; de Castro, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. 2011. Elsevier, 68(1): 109-115.
- [34] – Alamsyah, Gandhi; Albels, Vania Anisya; Sahlan, Muhammad; Hermansyah, Heri. Effect of chitosan's amino group in adsorption-crosslinking immobilization of lipase enzyme on resin to catalyze biodiesel synthesis. 2017. Elsevier, 136: 47-52.
- [35] – Wehtje, E. Parameters influencing enzyme activity in organic media. 1992. Tese de Doutorado. University of Lund, Sweden.
- [36] – Barros, R. J.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P. Mass Transfer studies on immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin biocatalysts prepared by deposition for use in organic medium. 1998. Biotechnol, Bioeng, 59, 364-373.
- [37] – Persson, Mattias; Wehtje, Ernst; Adlercreutz, Patrick. Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum. 2000. Biotechnology Letters, 22: 1571-1575.
- [38] – Barros, R. J. Influence of internal diffusional limitations on the performance of an immobilized enzyme in organic medium. 1999. University of Lund, Sweden.
- [39] – Wisdom, R. A.; Dunnill, P.; Lilly, M. D. Enzymatic interesterification of fats: the effect of non-lipase material on immobilized lipase. 1985. Enzyme Microb, Technol, 7, 567-572.

- [40] – Lage, Flávia A. P.; Bassi, J. J.; Corradini, M. C. C.; Todero, L. M.; Luiz, J. H. H.; Mendes, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. 2016. Elsevier, 84: 56-67.
- [41] – Ramos, Elisa Z.; Júnior, R. H. M.; de Castro, P. F.; Tardioli, P. W.; Mendes, A. A.; Fernández-Lafuente, Roberto; Hirata, D. B. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. 2015. Elsevier, 118: 43-51.
- [42] – Goderis, H. L.; Ampe, G.; Feyten, M. P.; Fouwé, B. L.; Guffens, W. M.; Van Cauwenbergh, S. M.; Tobback, P. P. Lipase-catalyzed ester Exchange reactions in organic media with controlled humidity. 1987. Biotechnol, Bioeng, 30, 258-266.
- [43] – Zoungrana, T.; Findenegg, G. H.; Norde, W. Structure, stability and activity of adsorbed enzymes. 1997. J. Coll. Inter. Sci, 190, 437-448.
- [44] – Dhawane, S. H.; Kumar, Tarkeshwar; Halder, Gopinath. Process optimization and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel. 2018. Elsevier, 176: 55-68.
- [45] – Bovara, R.; Carrea, G.; Ottolina, G.; Riva, S. Effects of water activity on  $V_{max}$  and  $K_m$  of lipase catalyzed transesterification in organic media. 1993. Biotechnol, Lett, 15, 937-942.
- [46] – Barros, R. J.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P. The selectivity of immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin biocatalysts prepared for use in organic medium. 2000. Biotechnol, Bioeng, 67, 319-326.
- [47] – Wehtje, E.; Adlercreutz, P. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. 1997. Biotechnol, Bioeng, 55, 798-806.
- [48] – Svensson, I.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. Lipase-catalyzed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity. 1992. J. Am. Oil Chem. Soc, 69, 986-991.
- [49] – Anthonsen, T.; D'Arrigo, P.; Pedrocchi-Fantoni, G.; Secundo, F.; Servi, S.; Sundby, E. Phospholipids hydrolysis in organic solvents catalysed by immobilised phospholipase C. 1999. J. Mol. Catal, B: Enzymatic, 6, 125-132.
- [50] – Mensah, P.; Gainer, J. L.; Carta, G. Adsorptive control of water in esterification with immobilized enzymes: I. Batch reactor behaviour. 1998. Biotechnol, Bioeng, 60, 434-444.
- [51] – Selmi, B.; Gontier, E.; Ergen, F.; Thomas, D. Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. 1998. Enzyme Microb, Technol, 23, 182-186.
- [52] – Ison, A. P.; Macrae, A. R.; Smith, C. G.; Bosley, J. Mass transfer effects in solvent-free fat interesterification reactions: influences on catalyst design. 1994. Biotechnol, Bioeng, 43, 122-130.



- [53] – Adlercreutz, P. On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. 1991. *Eur. J. Biochem*, 199, 609-614.
- [54] – Katchalski-Katzir, E. Medium and biocatalyst engineering. 1992. *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, Tramper, J., Vermue, M. H.; Beeftink, H. H.; von Stockar, U. (eds.) Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 3-9.
- [55] – Halling, P. J.; Valivety, R. H. Physical-chemical nature of low water systems for biocatalysis: especially phase behaviour, water activity and pH. 1992. Elsevier Science Publishers, 13-21.
- [56] – Zacharis, E.; Omar, I. C.; Patridge, J.; Robb, D. A.; Halling, P. J. Selection of salt hydrate pairs for use in water control in enzyme catalysis in organic solvents. 1997. *Biotechnol, Bioeng.* 55, 367-374.
- [57] – Garcia, Sílvia; Vidinha, Pedro; Arvana, Helena; Silva, M. D. R. G.; Ferreira, Olga; Cabral, J. M. S.; Macedo, E. A.; Harper, Neil; Barreiros, Susana. Cutinase activity in supercritical and organic media: water activity, solvation and acid-base effects. 2005. Elsevier.
- [58] – Giannetto, G. Zeolitas. 1990. Caracas.
- [59] – Ur Rahman, Amin; Khan, Farid Ullah; Rehman, Waheed Ur; Saleem, Sanum. Synthesis and Characterization of Zeolite 4A using Swat Kaolin. 2018. *Journal of Chemical Technology & Metallurgy*, Vol. 53 Issue 5, p825-829. 5p.
- [60] – Labik, L. K. Synthesis of zeolites and their applications to removal of arsenic and ammonia-nitrogen from samples of contaminated water. 2012. *Dissertação de Mestrado*. Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi.
- [61] – Yagiz, F.; Kazan, D.; Akin, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. 2007. *Chem. Eng. J.*, 134, 262–267.
- [62] – Jayamaha, J. H. Sisira. K. Supported Enzymes as Catalysts for Biodiesel Production. 2014. *Masters Dissertation*. Superior Technical Institute.
- [63] – Serralha, Maria. Utilização de zeólitos para a imobilização de uma cutinase recombinante. 2000. *Dissertação de Doutorado*. Instituto Superior Técnico.
- [64] – Serralha, F. N.; Lopes, J. M.; Lemos, F.; Ramôa Ribeiro, F.; Prazeres, D. M. F.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. Application of factorial design to the study of an alcoholysis transformation promoted by cutinase immobilized on NaY zeolite and Accurel PA6. 2004. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27(1), 19–27.
- [65] – Peres, C.; Harper, N.; Silva, M. D. R. G.; Barreiros, S. Effect of zeolites on lipase catalyzed esterification in nonaqueous media. 2005. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(1), 145–149.

- [66] – Frimpong, K. I.; Nagre, D. R.; Nti, Lawrence. The Effect of Water Sorbent on Lipase-Catalysed Esterification of Fatty Acid. 2015. Science and Technology, 5(1): 15-19.
- [67] – De Vasconcellos, A.; Paula, A. S.; Filho, R. A. L.; Farias, L. A.; Gomes, E.; Aranda, D. A. G.; Nery, J. G. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. 2012. Microporous and Mesoporous Materials, 163, 343–355.
- [68] – Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. Understanding Enzyme Immobilisation. 2009. Chem. Soc. Ver, 38. 453–468.
- [69] – Maksym, P.; Tarnacka, M.; Dzienia, A.; Matuszek, K.; Chrobok, A.; Kaminski, K.; Paluch, M. Enhanced polymerization rate and conductivity of ionic liquid-based epoxy resin. 2017. Macromolecules, 50, 3262–3272.
- [70] – Kirk, O.; Christensen, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. 2002. Org. Process Res. Dev. 6, 446–451.
- [71] – Ferrario, V.; Ebert, C.; Knapic, L.; Fattor, D.; Basso, A.; Spizzo, P.; Gardossi, L. Conformational changes of lipases in aqueous media: A comparative computational study and experimental implications. 2011. Adv. Synth. Catal. 353, 2466–2480.
- [72] – Basso, A.; Braiuca, P.; Cantone, S.; Ebert, C.; Linda, P.; Spizzo, P.; Caimi, P.; Hanefeld, U.; Degraffi, G.; Gardossi, L. In silico analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads. 2007. Adv. Synth. Catal, 349, 877–886.
- [73] – Zdarta, Jakub; Meyer, S. A.; Jesionowski, Teofil; Pinelo, Manuel. A General Review: Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. 2018. Catalysts.
- [74] – Ashly, P. C.; Joseph, M. J.; Mohanan, P. V. Activity of diastase  $\alpha$ -amylase immobilized on polyanilines (PANIs). 2011. Food Chem, 127, 1808–1813.
- [75] – Jimenez Hamann, M. C.; Saville, B. A. Enhancement of tyrosinase stability by immobilization on Nylon 66. 1996. Food Bioprod. Process Trans. Inst. Chem. Eng. C, 74, 47–52.
- [76] – Wang, W.; Zhou, W.; Li, J.; Hao, D.; Su, Z.; Ma, G. Comparison of covalent and physical immobilization of lipase in gigaporous polymeric microspheres. 2015. Bioprocess Biosys. Eng. 38, 2107–2115.
- [77] – Abhijeet, B. M.; Sandeep, A. C.; Ketan, H. M.; Rekha, S. S. Extraction and characterization of chitosan from prawn shellwaste and its conjugation with cutinase for enhanced thermo-stability. 2018. Food Engineering and Technology Department, Institute of Chemical Technology. Matunga Mumbai-400019, India.
- [78] – Abhijeet, B. M.; Sandeep, A. C.; Ketan, H. M.; Rekha, S. S. Non-covalent conjugation of cutinase from *Fusarium* sp. ICT SAC1 with pectin for enhanced stability: *Process minutiae*,

kinetics, thermodynamics and structural study. 2017. Food Engineering and Technology Department, Institute of Chemical Technology. Matunga Mumbai-400019, India.

[79] – Martinez, C.; De Geus, P.; Lauwereys, M.; Matthyssens, G. C. C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. 1992. *Nature*, 356, 615-618.

[80] – Kolattukudy, P. E. Cutinase from fungi and pollen. 1984. *Lipases*. Borgström, B., Brockman, H. L. (eds). Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. 471-504.

[81] – Soliday, C. L.; Flurkey, W. H.; Kolattukudy, P. E. Cloning and structure determination of cDNA for cutinase, and enzyme involved in fungal penetration of plants. 1984. *Proc, Natl, Acad, Sci, USA*, 81. 3939-3943.

[82] – Lauwereys, M.; De Geus, P.; De Meutter, J.; Stanssens, P.; Matthyssens, G. Cloning, expression and characterization of cutinase, a fungal lipolytic enzyme. 1991. *Lipases-Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, Alberghina, L.; Schmid, R. D.; Verger, R. (eds), CVH, Weinheim.

[83] – Prazeres, João. Production medium optimization for extracellular expression of cutinase Enzyme. 2018. Degree Report. Superior School of Technology of Barreiro - Superior Technical Institute.

[84] – Lackner, Marcel. Process integration for the production and purification of cutinase in a recombinant strain of *E. coli*. 2016. Bachelor Thesis of Bachelor Program Biotechnology. FACHHOCHSCHULE BINGEN UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES, Bingen – Germany.

[85] – Verger, R. Enzyme kinetics of lipolysis. 1980. *Methods in Enzymology*. Purich, D. L. (ed). Academic Press. Inc.. New York, 64. 340-392.

[86] – Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolov, F.; Oefner, C.; Goldman, A. T. L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* a prototypic acetylcholine-binding protein. 1991. *Science*, 253, 872-879.

[87] – De Barros, D. P. C.; Azevedo, A. M.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. Optimization of Flavor Esters Synthesis By *Fusarium solani* pisi cutinase. 2011. *Journal of Food Biochemistry*, 36(3), 275-284.

[88] – Cunnah, P. J.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. Esterification and Transesterification Catalysed by Cutinase in Reverse Micelles of Ctab For the Synthesis of Short Chain Esters. 1996. *Biocatalysis and Biotransformation*, 14(2), 125–146.

[89] – Badenes, S. M.; Lemos, F.; Cabral, J. M. S. Stability of cutinase, wild type and mutants, in AOT reversed micellar system-effect of mixture components of alkyl esters production. 2011. *Journal of Chemical Technology, Biotechnology*, 85(1): 34-41.

[90] – Rodrigues, J.; Canet, A.; Rivera, I.; Osório, N. M.; Sandoval, G.; Valero, F.; Ferreira-Dias, S. Biodiesel production from crude *Jatropha* oil catalyzed by non-commercial

immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* and *Carica papaya* lipases. 2016. Elsevier, 213, 88-95.

[91] – Kulkarni, M. G.; Dalai, A. K. Waste cooking oil — an economical source for biodiesel: a review. 2006. Ind Eng Chem Res, 45, 2901–13.

[92] – Kroumov, A. D.; Módenes, A. N.; Wenzel, B. M. Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. 2007. Acta Sci, Technol. Maringá, v. 29, n. 1, p. 9-16.

[93] – Mendes, L. F. B. Produção de biodiesel, situação atual e perspectivas futuras. 2015. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.

[94] – Almeida, H. S. Produção de biocombustíveis via craqueamento térmico-catalítico de resíduos sólidos de caixas de gordura com carbonato de sódio e lama vermelha ativada termicamente. 2015. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal do Pará, Brasil.

[95]– Pereira, A. M. Estudo do processo de craqueamento térmico catalítico do sebo bovino para produção de biocombustíveis. 2017. Proderna. Belém, Brazil.

[96] – Silva, Denise da; Carlan, F. A.; München, Sinara. Biodiesel: Uma experiência com alunos do Ensino Tecnológico. 2012. # Tear: Revista de Educação Ciência e Tecnologia, Canoas, v.1, n.2.

[97] – Dewajani, H., Rochmadi; Purwono, S.; Budiman, A. Catalytic cracking of indonesin nyamplung oil (*Calophyllum inophyllum*) for bio-fuels production using ZSM-5 catalyst. 2014. J. of Eng. Science and Technology, p. 61-69.

[98] – Prado, C. M. R.; Antoniosi Filho, N. R. Production and characterization of the biofuels obtained by thermal cracking and thermal catalytic cracking of vegetable oils. 2009. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 86(2), 338–347.

[99] – Xu, J.; Jiang, J.; Zhang, T.; Dai, W. Biofuel Production from Catalytic Cracking of Triglyceride Materials Followed by an Esterification Reaction in a Scale-up Reactor. 2013. Energy & Fuels, 27(1), 255–261.

[100] – Da Silva, A. H.; Corrêa, O. A.; Eid, J. G.; Ribeiro, H. J.; de Castro, D. A. R.; Pereira, M. S.; Mâncio, A. A.; Santos, M. C.; Souza, J. A. S.; Borges, L. E. P.; Mendonça, N. M.; Machado, N. T. Production of biofuels by thermal catalytic cracking of scum from grease traps in pilot scale. 2016. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 118, 20–33.

[101] –López, C. B.; Cerdán, E. L.; Medina, R. A.; López, N. E.; Valverde, M. L.; Peña, H. E.; Moreno, G. A. P.; Grima, M. E. Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification. 2015. Journal of Bioscience and Bioengineering. Elsevier B. V, 119(6), 706-711.

[102] – Zaher, F. A.; Soliman, H. M. Biodiesel production by direct esterification of fatty acids with propyl and butyl alcohols. 2015. Egyptian Journal of Petroleum, 24(4), 439–443.

- [103] –Vieira, A. P. A.; da Silva, P. M. A.; Langone, M. A. P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. 2006. Lat. Am. appl. Res, V.36, N.4.
- [104] – Ramos, L. P.; Silva, F. R.; Mangrich, A. S.; Cordeiro, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. 2011. Rev. Virtual Quim, 3 (5), 385-405.
- [105] – Lam, M. K.; Lee, K. T.; Mohamed, A. T. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. 2010. Biotechnology Advances. Elsevier, 28, 500-518.
- [106] – Cao, L. Carrier-bound immobilized enzymes. Principles, application and design. 2005. Wiley- VCH. ISBN-10: 3-527-31232-3, Weinheim.
- [107] – Lotero, E.; Liu, Y.; Lopez, D. E.; Suwannakarn, K.; Bruce, D. A.; Goodwin, Jr JG. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. 2005. Ind Eng Chem Res, 44, 5353–63.
- [108] – de Almeida, R. M.; Noda, L. K.; Gonçalves, N. S.; Meneghetti, S. M. P.; Meneghetti, M. R. Transesterification reaction of vegetable oils, using superacid sulfated TiO<sub>2</sub> -base catalysts. 2008. Appl Catal A, 347, 100–5.
- [109] – Suarez, P. A. Z.; Plentz Meneghetti, S. M.; Meneghetti, M. R.; Wolf, C. R. Transformation of triglycerides into fuels, polymers and chemicals: some applications of catalysis in oleochemistry. 2007. Quim Nova, 30, 667–76.
- [110] – Magalhães, P. S. Estudo da Reação de Transesterificação Enzimática do óleo de palma e do comportamento das fases envolvidas. 2014. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- [111] – Kanthavelkumaran, N.; Seenikannan, Dr. P. Recent Trends and Applications of Bio Diesel. 2012. International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA), Vol. 2, Issue 6, pp. 197-203.
- [112] – Agarwal, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. 2007. Elsevier, 33, 233 - 271.
- [113] – Ko, Chun-Han; Yrh, Kai-Wun; Wang, Ya-Nang; Wu, Chien-Hou; Chang, Fang-Chih; Cheng, Ming-Hsun; Lion, Chia-Shin. Impact of methanol addition strategy on enzymatic transesterification of jatropha oil for biodiesel processing. 2012. Energy.

## Anexos

### Anexo I: Resultados das reações do biodiesel com metanol lidas em HPLC

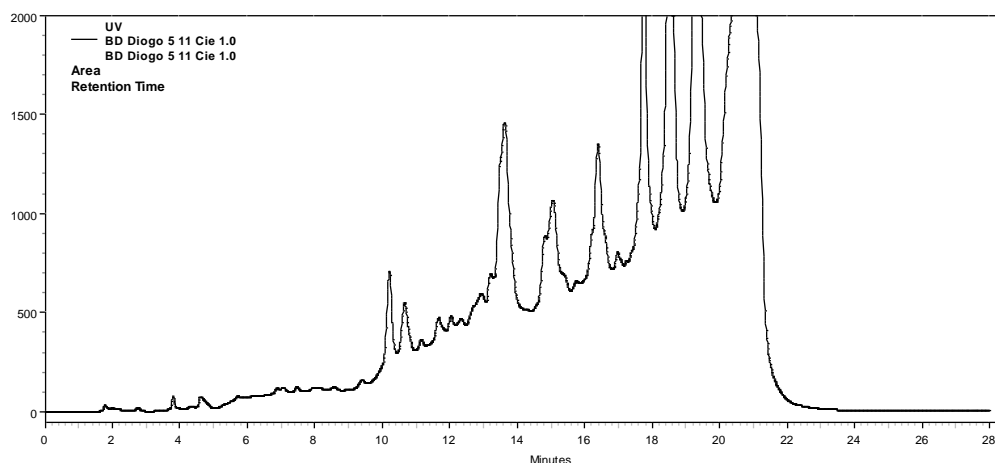


Figura A1 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do controle inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, 42,5 µl de água e sem suporte adicionado)

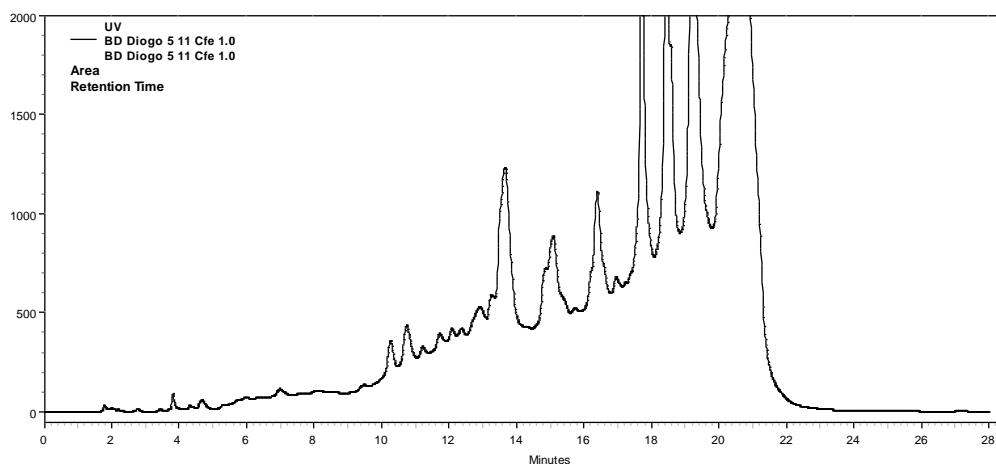


Figura A2 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do controle final (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, 42,5 µl de água e sem suporte adicionado)

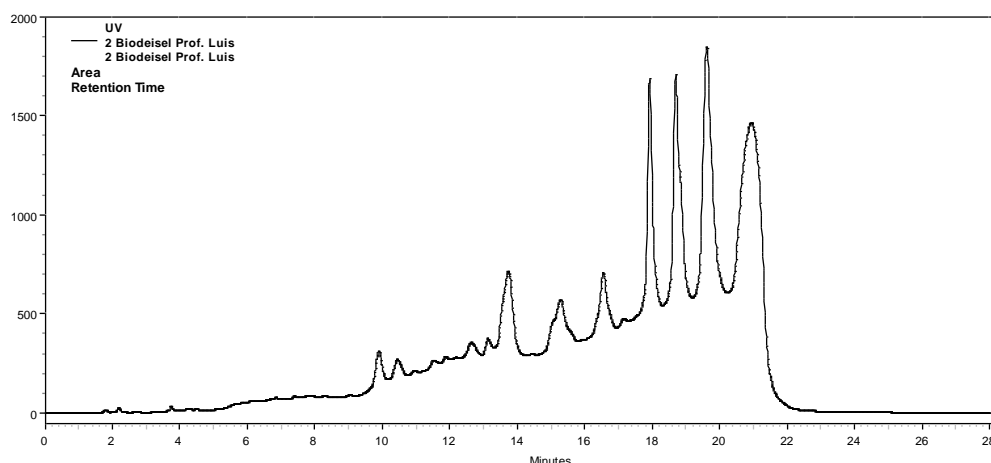


Figura A3 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do metacrilato de epoxi butilo (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, 42,5 µl de água e 50 mg de suporte)

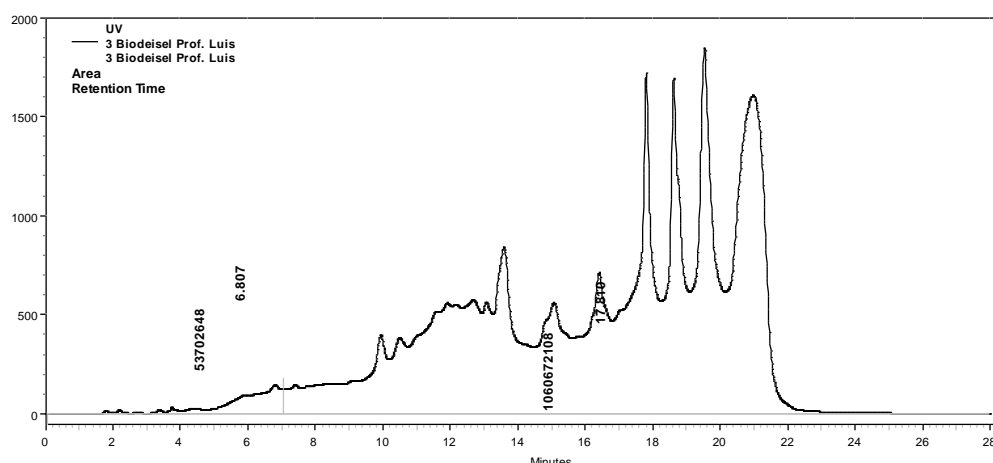


Figura A4 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de alumina (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, 42,5 µl de água e 50 mg de suporte)

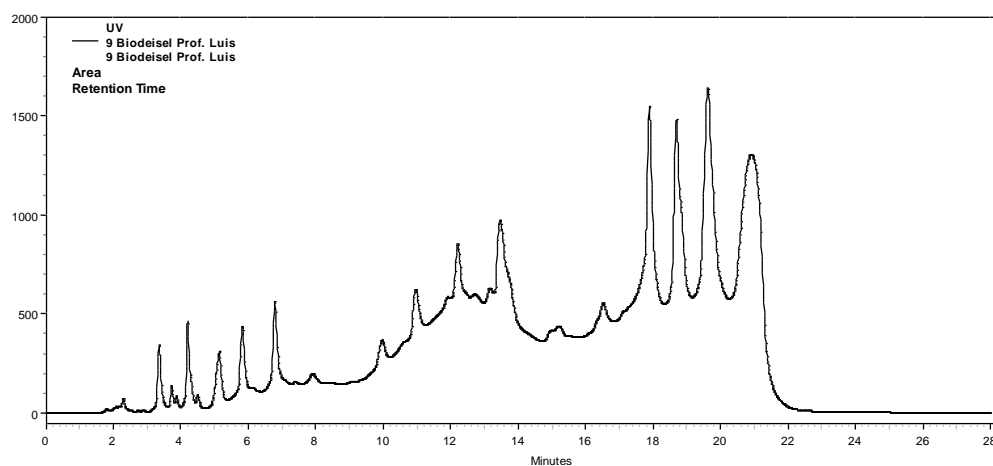


Figura A5 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra da Cal B (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, 42,5 µl de água e 5 mg de suporte)

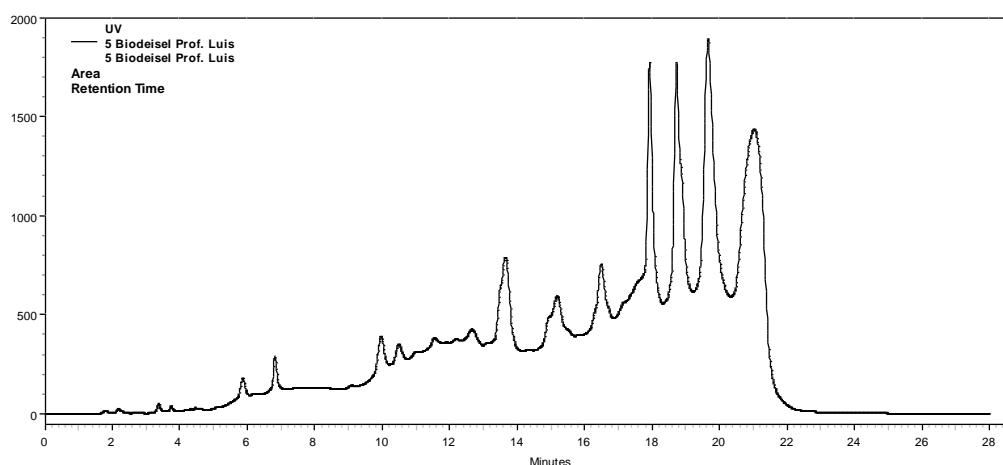


Figura A6 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra da cutinase livre J2 (atividade = 360 U/ml) (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, 42,5 µl de cutinase J2 e sem suporte adicionado)

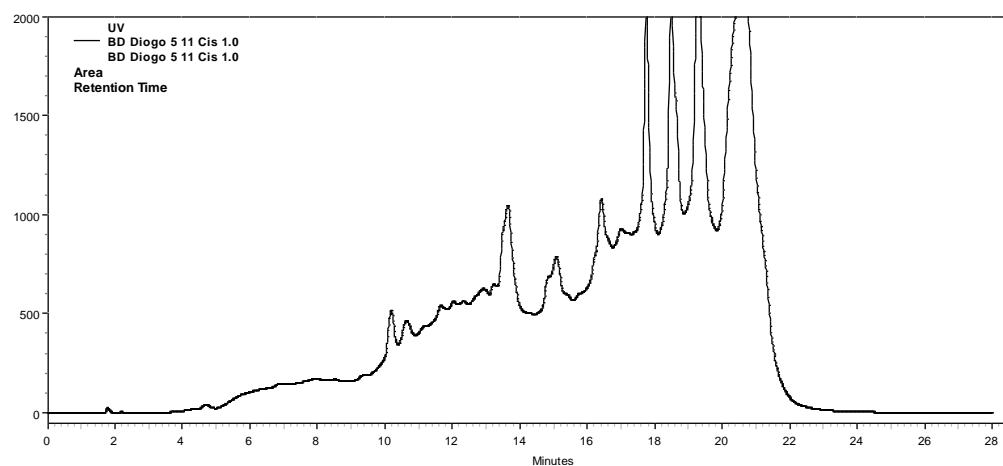


Figura A7 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controlo inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, sem água e suporte adicionado)

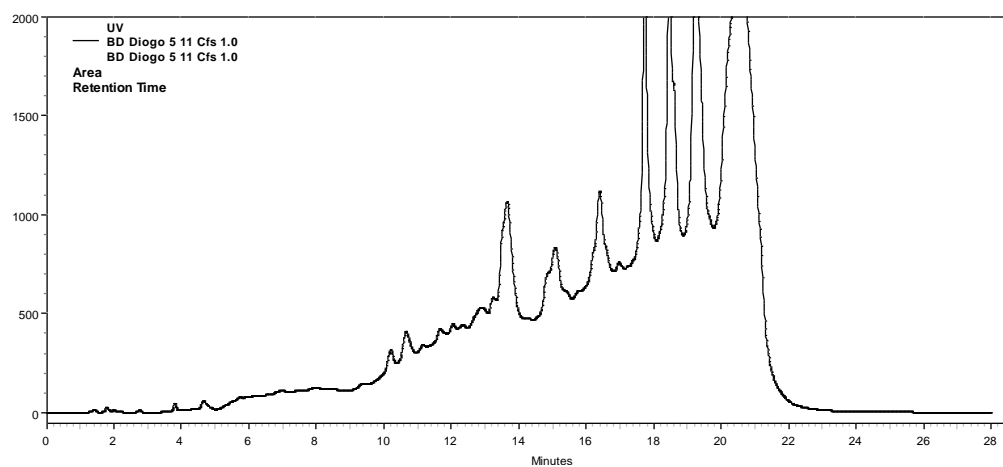


Figura A8 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controlo final (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, sem água e suporte adicionado)



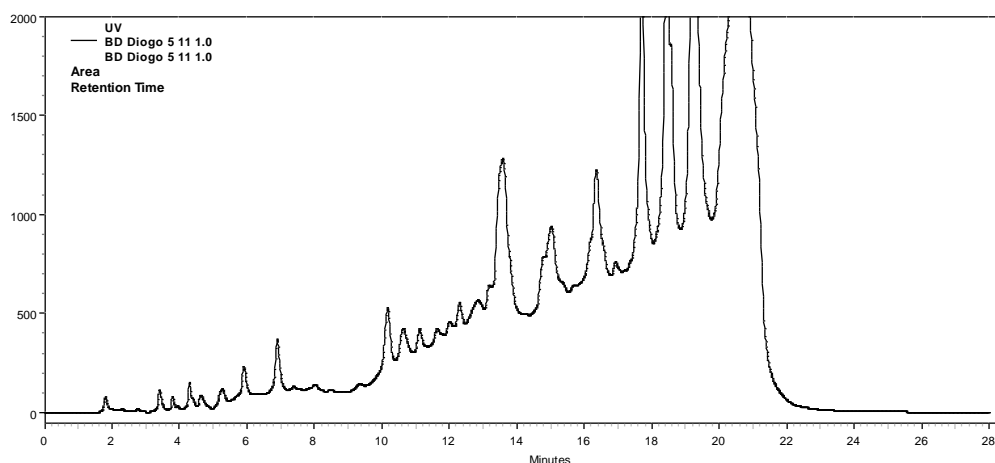


Figura A9 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do metacrilato de epóxi butilo (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol – adicionado aos terços a cada 4 horas -, sem água e 50 mg de suporte)

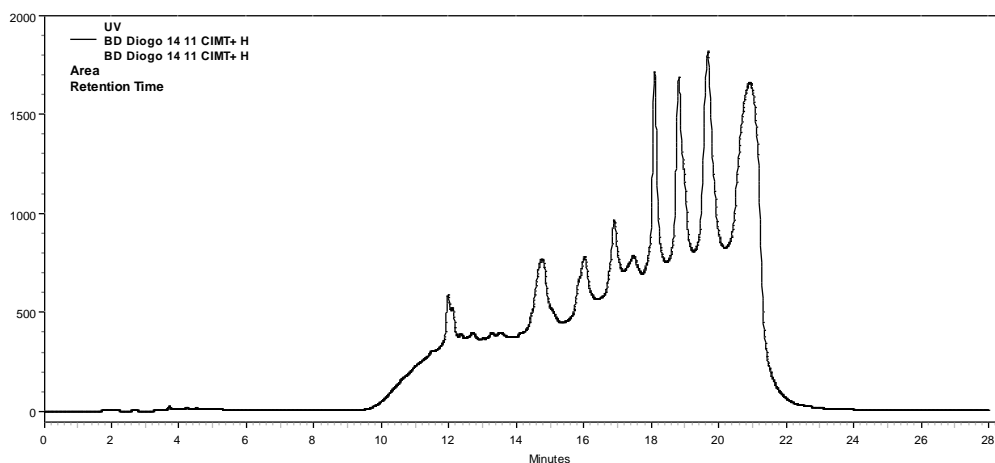


Figura A10 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol, 42,5 µl de água e sem suporte adicionado)

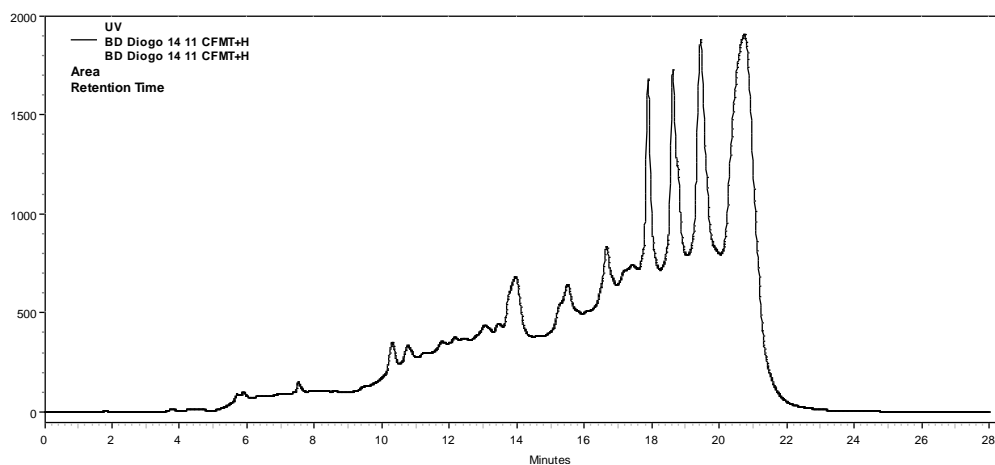


Figura A11 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol, 42,5 µl de água e sem suporte adicionado))

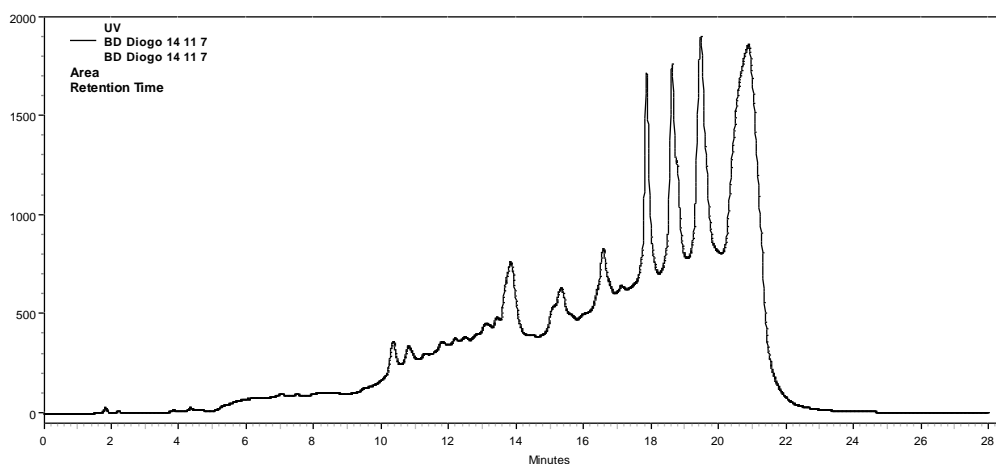


Figura A12 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do metacrilato de epoxi butilo (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol, 42,5 µl de água e 50 mg de suporte)

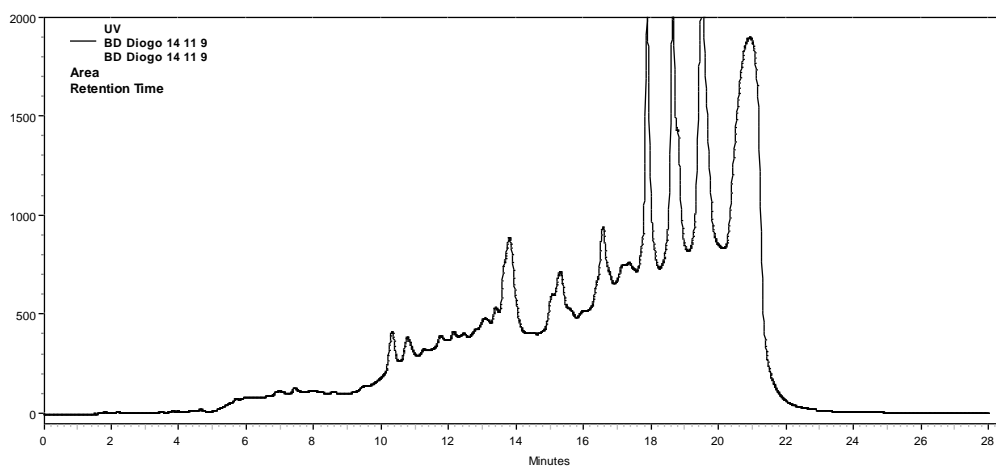


Figura A13 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de alumina (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol, 42,5 µl de água e 50 mg de suporte)

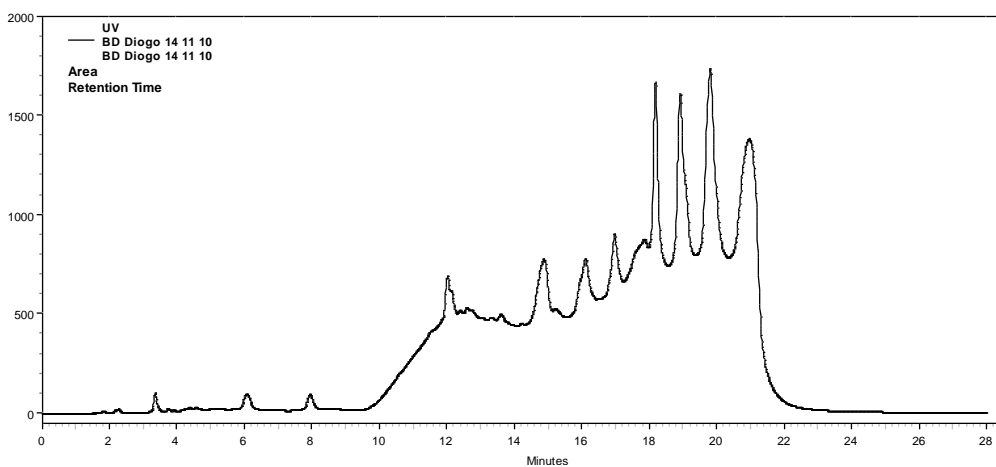


Figura A14 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra da Cal B (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol, 42,5 µl de água e 5 mg de suporte)

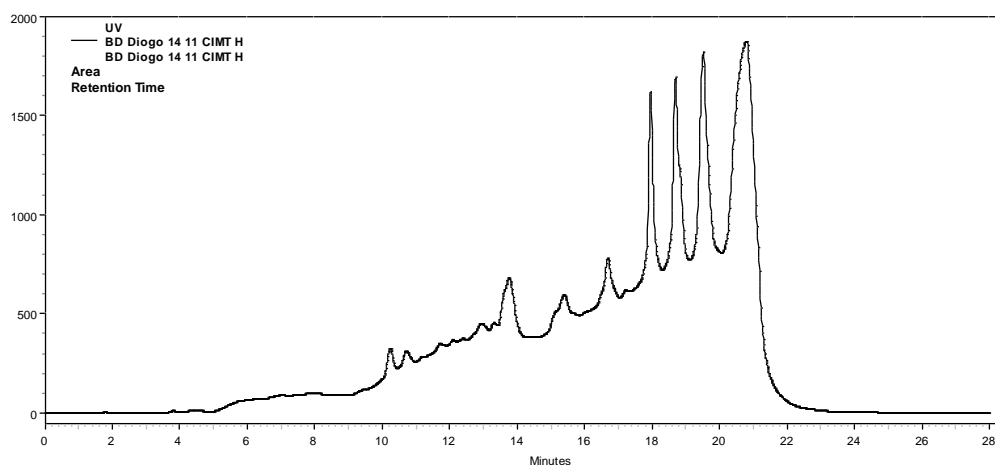


Figura A15 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol, sem água e suporte adicionado)

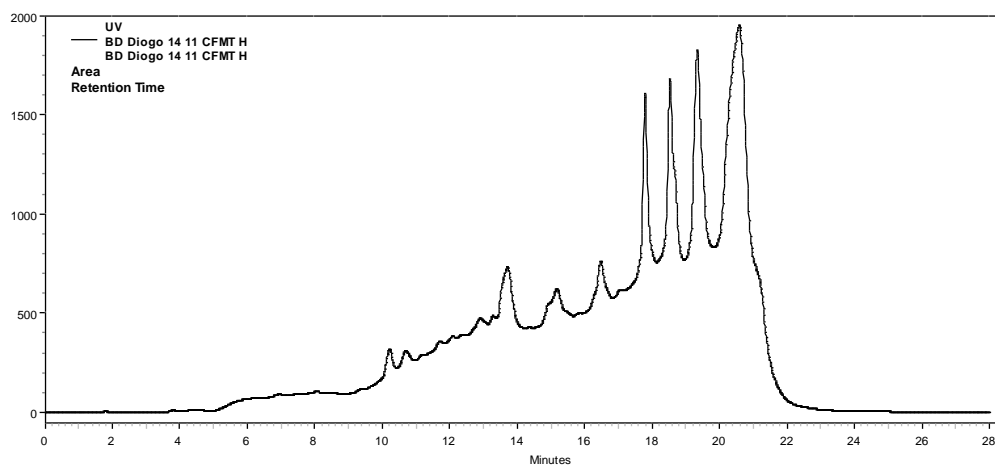


Figura A16 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle final (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol, sem água e suporte adicionado)

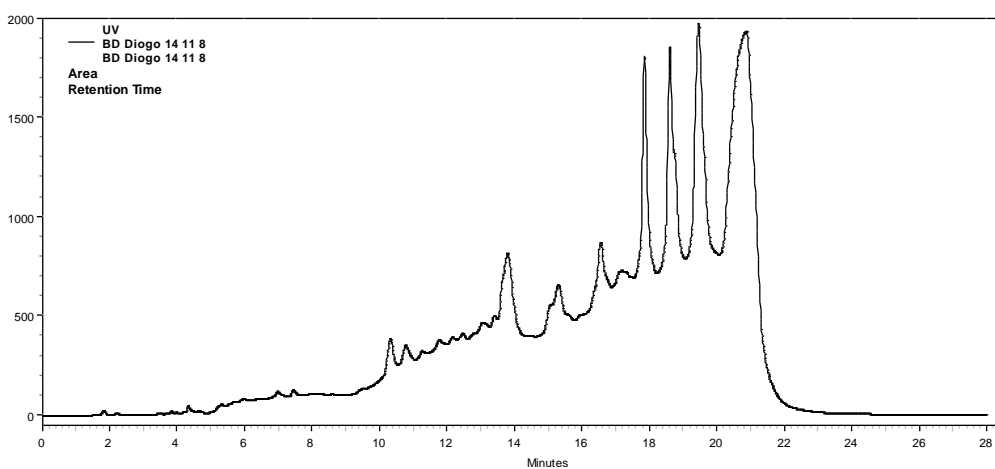


Figura A17 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do metacrilato de epóxi butilo (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de metanol, sem água e 50 mg de suporte)

## Anexo II: Resultados das reações do biodiesel com butanol lidas em HPLC

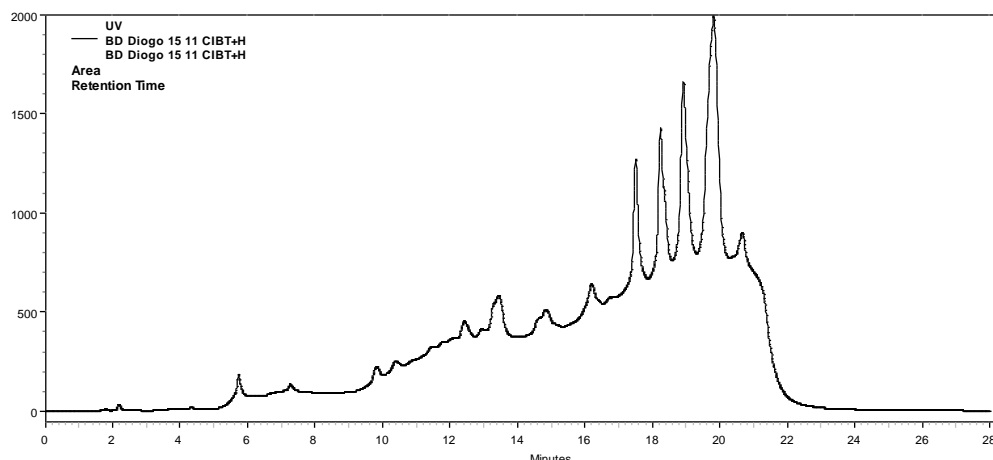


Figura A18 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol, 42,5 µl de água e sem suporte adicionado)

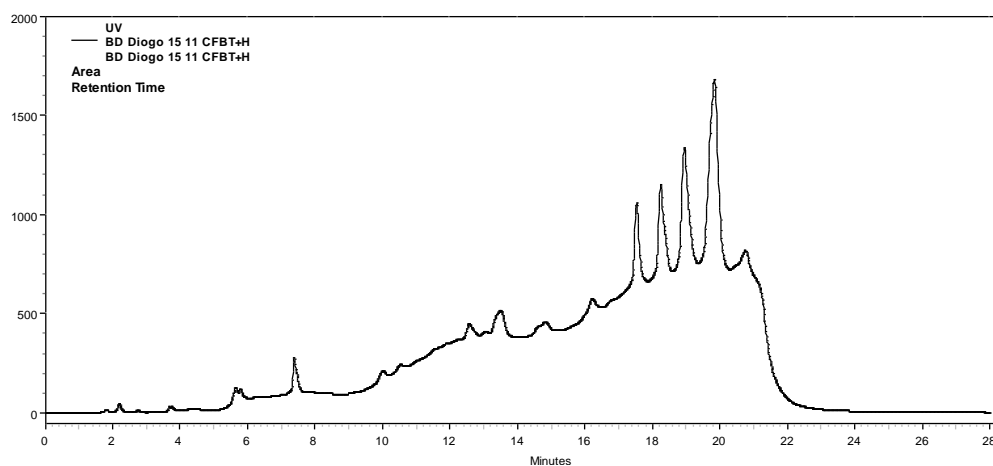


Figura A19 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle final (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol, 42,5 µl de água e sem suporte adicionado)

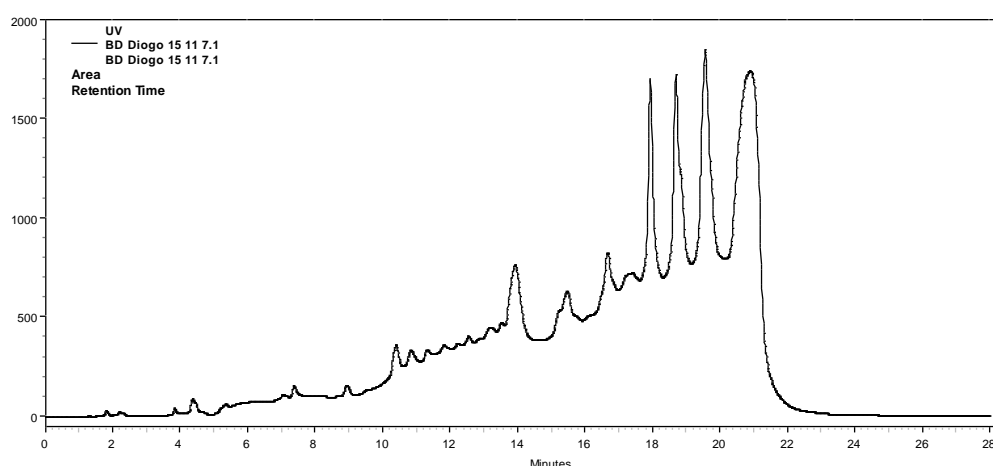


Figura A20 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do metacrilato de epoxi butilo (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol, 42,5 µl de água e 50 mg de suporte)

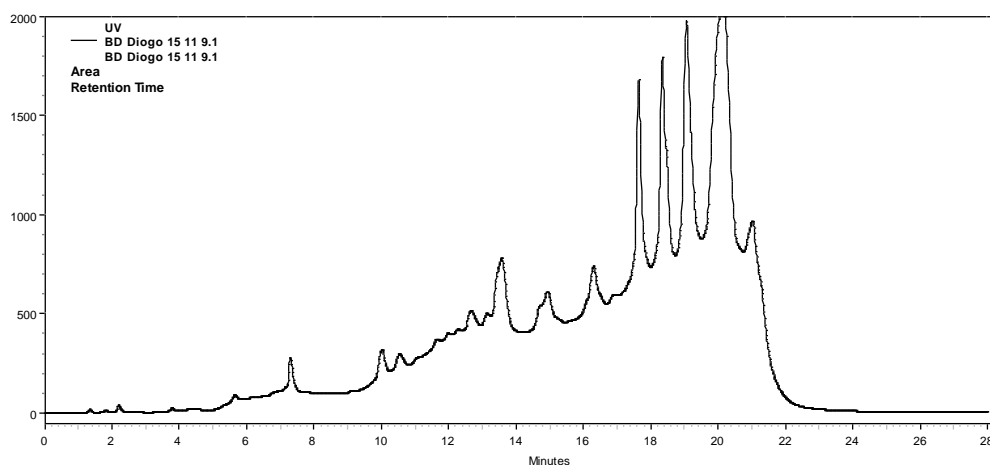


Figura A21 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de alumina (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol, 42,5 µl de água e 50 mg de suporte)

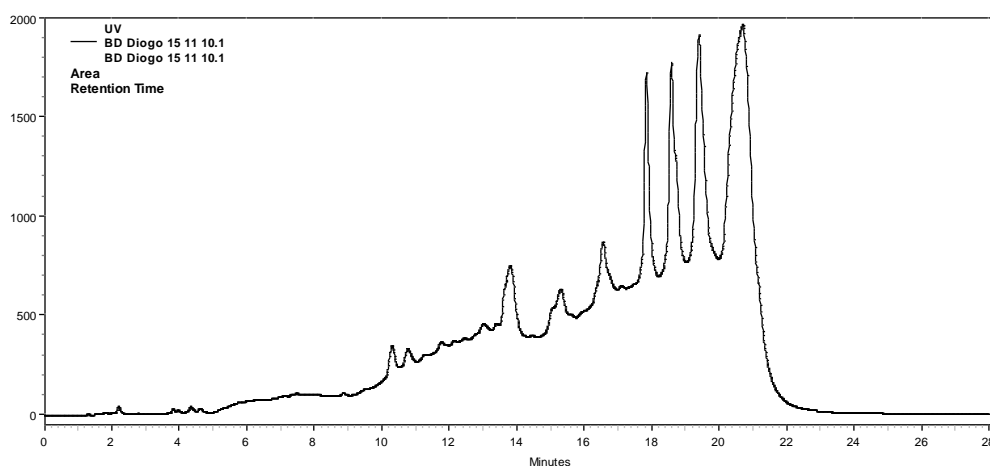


Figura A22 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra da Cal B (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol, 42,5 µl de água e 5 mg de suporte)

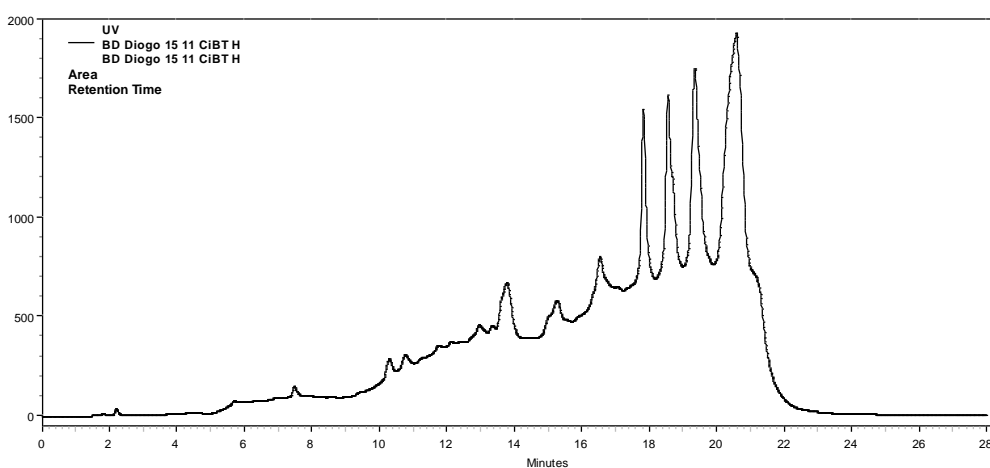


Figura A23 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controlo inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol, sem água e suporte adicionado)

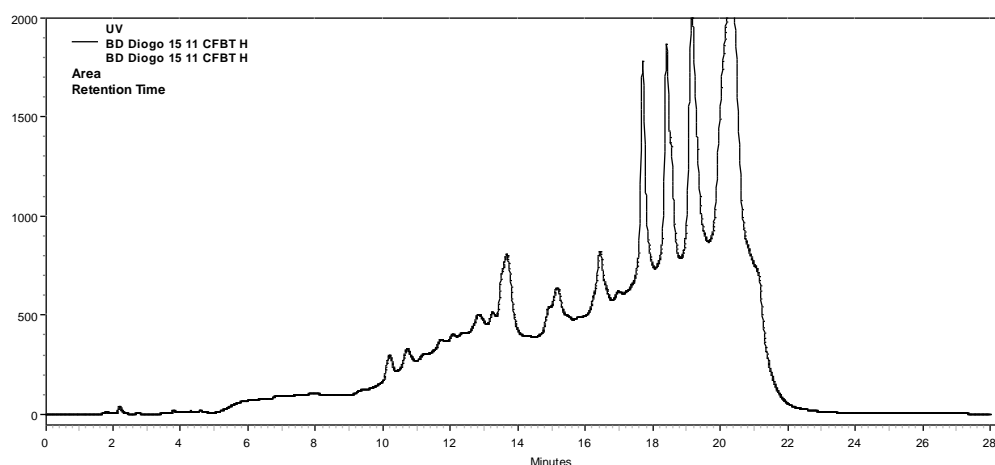


Figura A24 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle final (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol, sem água e suporte adicionado)

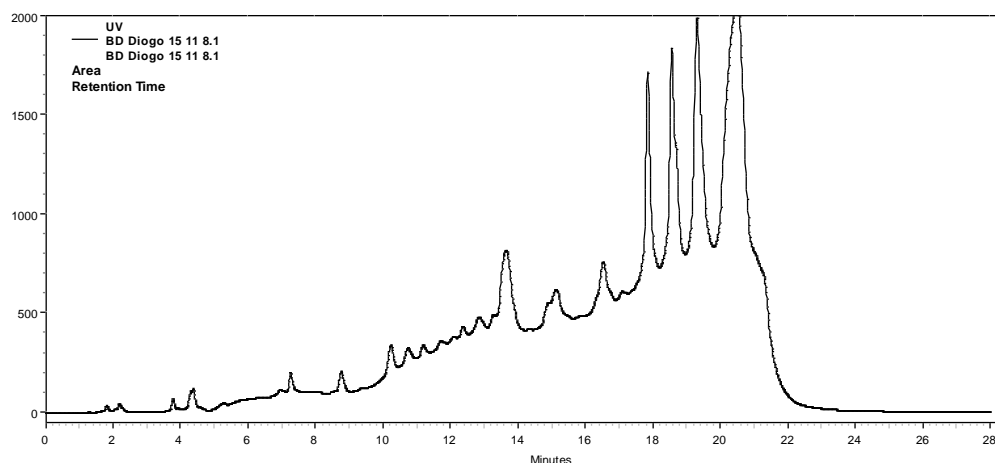


Figura A25 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do metacrilato de epoxi butilo (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de butanol, sem água e 50 mg de suporte)

### Anexo III: Resultados das reações do biodiesel com etanol lidas em HPLC

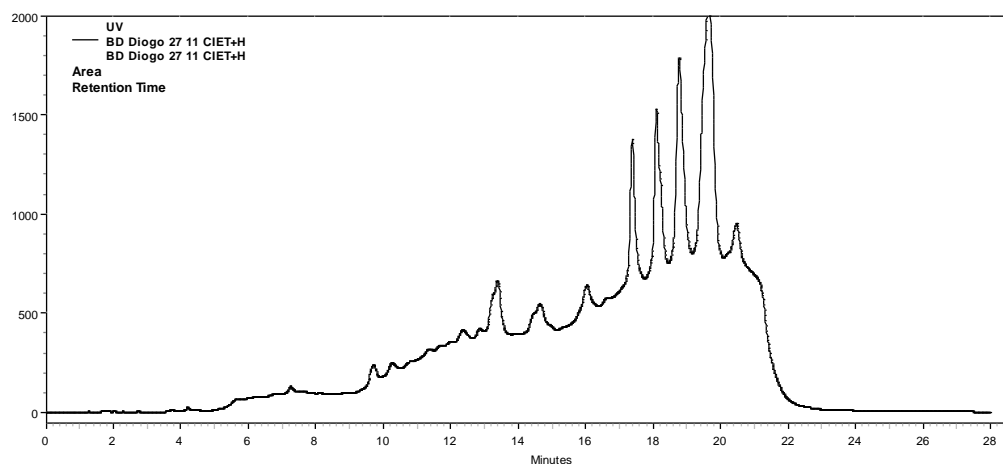


Figura A26 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol, 42,5 µl de água e sem suporte adicionado)

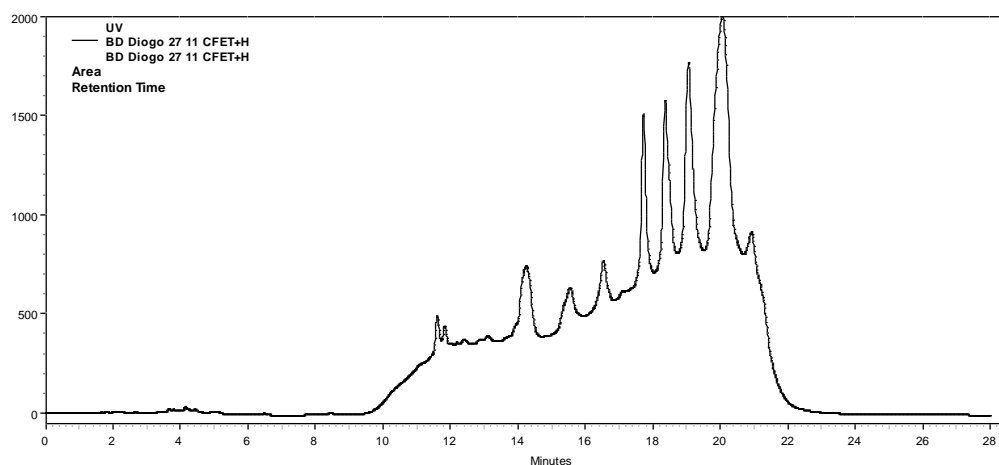


Figura A27 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controle final (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol, 42,5 µl de água e sem suporte adicionado)

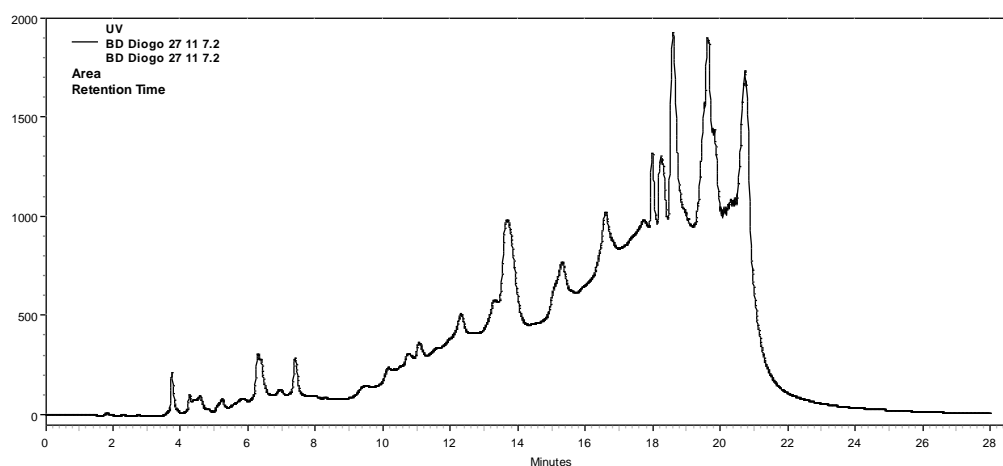


Figura A28 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra do metacrilato de epóxi butilo (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol, 42,5 µl de água e 50 mg de suporte)

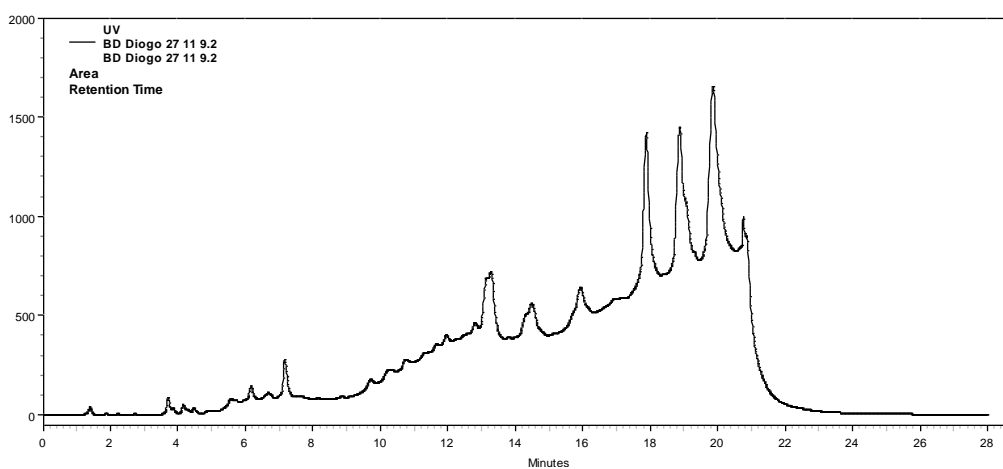


Figura A29 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de alumina (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol, 42,5 µl de água e 50 mg de suporte)

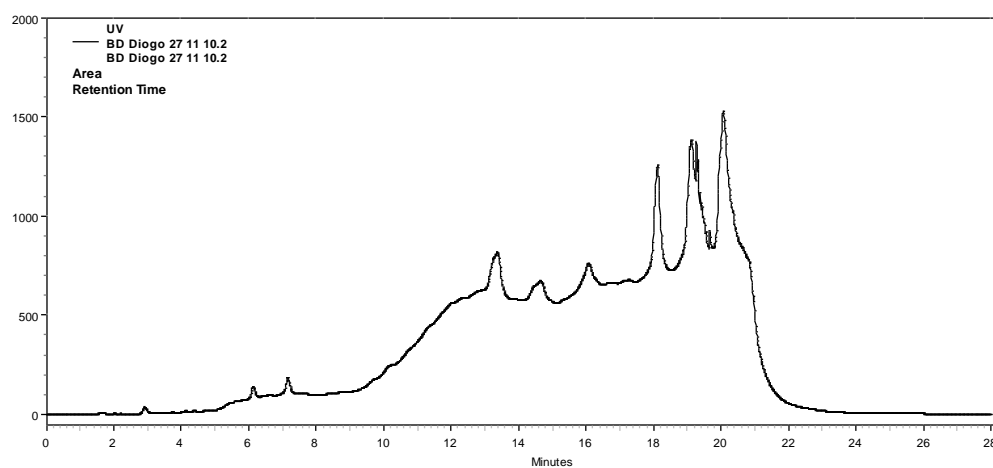


Figura A30 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra da Cal B (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol, 42,5 µl de água e 5 mg de suporte)

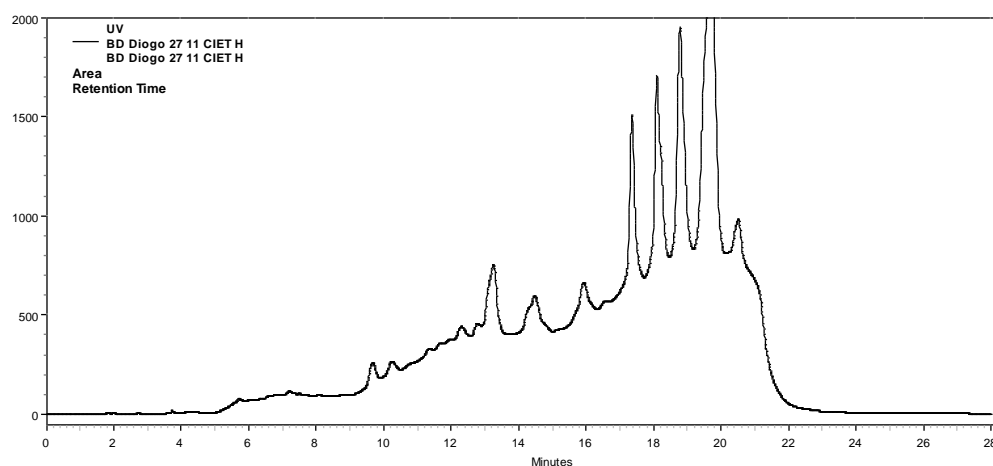


Figura A31 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controlo inicial (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol, sem água e suporte adicionado)

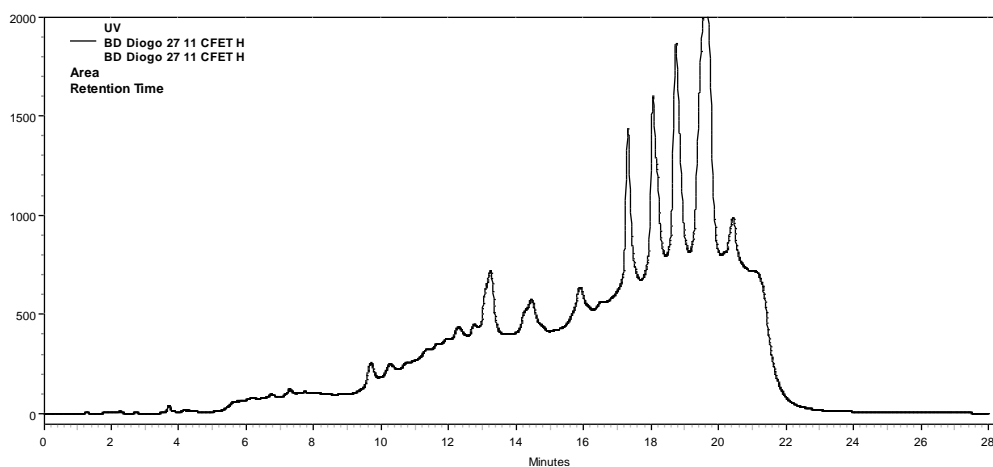


Figura A32 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controlo final (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol, sem água e suporte adicionado)



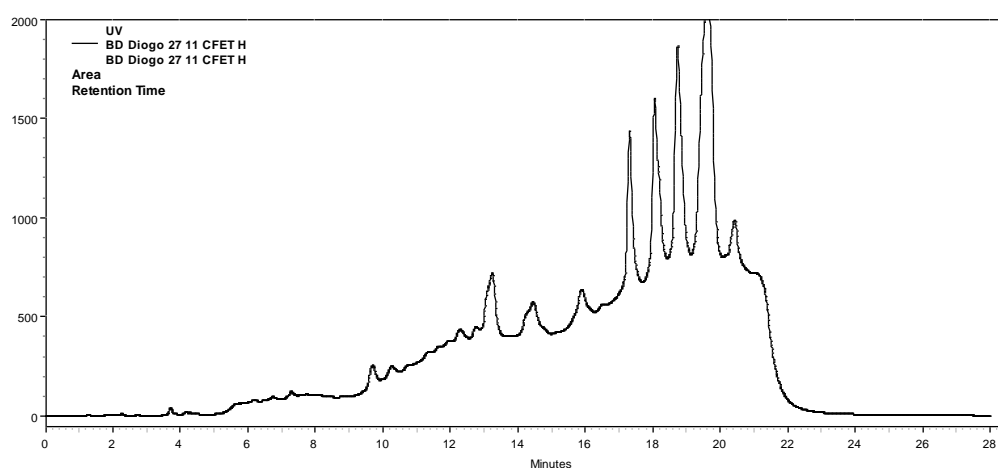


Figura A33 – Representação gráfica da leitura em HPLC da amostra de controlo final (0,95 g de trioleína, 142,5 µl de etanol, sem água e suporte adicionado)